DAS CITRATABHÄNGIGE EISENTRANSPORTSYSTEM BEI ESCHERICHIA COLI K12 INDUKTION VON AUSSEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

SABER HUSSEIN

aus Al-Khader/Palästina

1980

DAS CITRATABHÄNGIGE EISENTRANSPORTSYSTEM BEI ESCHERICHIA COLI K12 INDUKTION VON AUSSEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

SABER HUSSEIN

aus Al-Khader/Palästina

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:		25.9.1980
Dekan	:	Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. V. Braun
2. Berichterstatter	:	Priv. Doz. Dr. K. Hantke

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen angefertigt.

Für die Überlassung des Themas und die stete Förderung während der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. V. Braun.
Fräulein Helga Wolff danke ich für die Anfertigung der Photographien der Abbildungen.
Bruno Ebersphächer, Klaus Günthner, Toni Hartmann und Willi Wagegg danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Die äußere Membran als Permeationsbarriere	1
1.2.	Induktion	4
1.3.	Eisenaufnahme	6
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Chemikalien	10
2.2.	Nährmedien	11
2.3.	Versuchsorganismen	12
2.4.	Zusammensetzung des Minimalmediums für AB2847	13
2.5.	Glaswaren- und Medienvorbehandlung	13
2.5.1.	Behandlung der Glaswaren	13
2.5.2.	Extraktion des Eisens aus Salz- und Glucoselösungen	13
2.6.	Kulturbedingungen	14
2.6.1.	Aerobes Wachstum	14
2.6.2.	Anaerobes Wachstum	14
2.7.	Testplatten	15
2.7.1.	Für aroB-Stamm (AB2847)	15
2.7.2.	Für hemA-Mutante (A1004C)	15
2.7.3.	Für Wachstum stimulierende oder hemmende Substrate	15
2.8.	Verdünnungsexperiment	16
2.9.	Transportmessungen	16
2.10.	Extraktion von Zellen durch Kochen	17
2.11.	Dünnschichtchromatographische Identifizierung von Citrat	18
2.12.	Enzymatische Citratbestimmung	19
2.12.1.	Präparation von Zellextrakten für die intrazelluläre Citratbestimmung	19
2.12.2.	Testansatz und Durchführung	19
2.13.	Zellaufschluß mit der French-Presse	20
2.14.	Behandlung der Zellen mit Pronase	21
2.15.	Bestimmung der Überlebensrate (24)	22

		Seite
2.16.	Osmotischer Schock (52) und Aufnahmetest mit geschockten Zellen	22
2.17.	Membrantrennung (86)	23
2.18.	Protein- und Peptidbestimmung mit Fluram	24
2.19.	Gelelektrophorese (62, 69)	24
3.	ERGEBNISSE	26
3.1.	Induktion des citratabhängigen Eisentransportsystems	26
3.1.1.	Untersuchungen über die Spezifität des Citratsystems	26
3.1.1.1.	Induktorspezifität des Citratsystems	26
3.1.1.2.	Ligandenspezifität des Citratsystems	30
3.1.1.3.	Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Induktion durch Fluorocitrat und Citrat	31
3.1.1.4.	Induktion des FecA-Proteins durch Fluorocitrat	34
3.1.2.	Schicksal des Citrats während der Induktion	35
3.1.2.1.	Citrataufnahme bei wachsenden Zellen	35
3.1.2.2.	Verfolgung der ^{14}C-Aktivität im Medium und Identifizierung des Citrats auf DC-Platten	37
3.1.2.3.	Citrataufnahme bei nicht wachsenden Zellen	39
3.1.3.	Intrazelluläres Citrat induziert das citratabhängige Eisentransportsystem nicht	43
3.1.4.	Aufrechterhaltung der Induktion	45
3.1.4.1.	Ausverdünnung des Eisen-Citrattransportsystems beim Wachstum im citratfreien Medium - oder die Notwendigkeit der Daueranwesenheit des Induktors	46
3.1.4.2.	Auch die Aufrechterhaltung des Eisen-Citrattransportsystems verlangt hohe Citratkonzentrationen	46
3.1.4.2.1.	Initialinduktion bei verschiedenen Citratkonzentrationen	46
3.1.4.2.2.	Aufrechterhaltende Citratkonzentrationen	48
3.2.	Bedeutung der Eisenversorgung für die Regulation des Citrat-abhängigen Eisentransportsystems	51

		Seite
3.2.1.	Einfluß der Eisenkonzentration im Vorwachstum auf die Aufnahmeaktivitäten der Ferrichrom- und Citratsysteme	52
3.2.2.	Einfluß von Ferrichrom auf die Induktion des Eisen-Citratsystems	53
3.2.2.1.	Reprimierung der Eisenaufnahme bei E. coli AB2847 nach Wachstum im Ferrichrom-haltigen Medium	53
3.2.2.2.	Reprimierung des citratabhängigen Eisentransports auf Induktionsebene durch Desferri-Ferrichrom	54
3.2.2.2.1.	AB2847	55
3.2.2.2.2.	P8 (tonA-Mutante)	55
3.2.3.	Einfluß von DHB bzw. Enterochelin auf die Induktion des Citratsystems bei den fep-Mutanten	58
3.2.3.1.	Induktion des citratabhängigen Eisentransports bei IR20 (fepA-Mutante) durch Citrat	59
3.2.3.2.	Bei AN260 (fepB-Mutante)	59
3.2.4.	Einfluß des Kupfers auf die Induktion und die Aufnahmeaktivität des Eisen-Citratsystems bei E. coli AB2847	62
3.2.4.1.	Hemmung des Wachstums durch Cu^{2+} und Aufhebung der Hemmung durch Citrat	62
3.2.4.1.1.	Plattentest	62
3.2.4.1.2.	Hemmung des Wachstums und ihre Aufhebung in Flüssigkulturen	62
3.2.4.2.	Eisenaufnahme nach Wachstum in Anwesenheit von Cu^{2+} und Citrat	64
3.2.4.3.	Kompetitionsversuche mit Cu^{2+}	66
3.3.	Untersuchungen zur Wirkung verschiedener C-Quellen auf das Eisen-Citrat-Transportsystem bei E. coli K12 AB2847	69
3.3.1.	Acetat	69
3.3.2.	Glyzerin	70
3.3.3.	Lactat	70
3.3.4.	Pyruvat	73
3.4.	pH-Einfluß auf die Eisen-Citrataufnahme	73
3.5.	Wirkung von künstlichen Veränderungen an der Zellperipherie auf den Eisentransport	75

		Seite
3.5.1.	Behandlung ganzer Zellen mit Pronase	75
3.5.1.1.	Lebensfähigkeit nach der Behandlung	75
3.5.1.2.	Wirkung der Pronase auf den Eisentransport	76
3.5.1.2.1.	AB2847	76
3.5.1.2.2.	P8 (tonA-Mutante)	78
3.5.1.2.3.	BR158 (tonB-Mutante)	80
3.5.1.3.	Verändertes Proteinmuster der Außenmembran von E. coli K12 nach Behandlung mit Pronase	81
3.5.2.	N-Äthylmaleinimidhemmung des Eisentransports	81
3.5.3.	Einfluß des osmotischen Schocks auf den Eisentransport	84
3.6.	Anaerobes Wachstum und Eisentransport	86
3.6.1.	Einfluß einiger Eisenchelatoren auf das anaerobe Wachstum von E. coli AB2847	87
3.6.2.	Aerober Transport nach anaerobem Wachstum	90
3.6.2.1.	Das Enterochelinsystem	90
3.6.2.2.	Das Ferrichromsystem	92
3.6.2.3.	Das citratabhängige Eisentransportsystem	92
3.6.2.3.1.	Aufrechterhaltung nach anaerobem Wachstum	92
3.6.2.3.2.	Zeitlicher Verlauf der aeroben Induktion mit Citrat nach anaerobem Wachstum und die Notwendigkeit einer de novo Proteinsynthese	94
3.6.2.3.3.	^{14}C-Citrataufnahme nach anaerobem Wachstum	97
3.7.	Ascorbatabhängiger Eisentransport bei E. coli	98
3.7.1.	Induktion des citratabhängigen Eisentransports in Anwesenheit von Citrat und Ascorbat	99
3.7.2.	Ascorbat stimuliert die Eisenaufnahme	99
4.	DISKUSSION	103
4.1.	Induktion von außen	103
4.2.	Weitere Charakterisierung des citratabhängigen Eisentransports	110

		Seite
4.3.	Anaerobes Wachstum und Eisentransport	113
5.	ZUSAMMENFASSUNG	117
6.	ANHANG	119
7.	LITERATURVERZEICHNIS	123

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aufn.	Aufnahme
CAN	Chloramphenicol
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Cit	Citrat
CL	Citrat-Lyase
cpm	"counts per minute"
DC	Dünnschichtchromatographie
DHB	2,3-Dihydroxybenzoesäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
EAM	Eisenaufnahmemedium
F-Acetat	Fluoroacetat
F-Citrat	Fluorocitrat
G6P	Glucose-6-phosphat
Hepes	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure
HPS	Hexosephosphataufnahmesystem
icd	Isocitratdehydrogenase
Konz.	Konzentration
LDH	Lactatdehydrogenase
MDH	Malatdehydrogenase
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NEM	N-Äthylmaleinimid
NTA	Nitrilotriacetat
OD_x	optische Dichte bei x nm
pABS	para-Aminobenzoesäure
pHBS	para-Hydroxybenzoesäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Std.	Stunde
TG, Tg.	Trockengewicht
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. EINLEITUNG

Bakterien sowie alle Organismen treten in eine ständige Wechselwirkung mit ihrer Umwelt und anderen Organismen. Diese Wechselwirkung erstreckt sich von der Aufnahme von lebensnotwendigen Nahrungsstoffen und der Ausscheidung von während ihres Stoffwechsels anfallenden schädlichen Abfallprodukten bis zum Austausch von genetischer Information über sexuelle oder parasexuelle Prozesse. Andererseits ist eine Abgrenzung des bakteriellen Individuums gegenüber seiner Umgebung die Grundvoraussetzung seiner Erhaltung als Zelle. Da die Zelle oft höhere Substratkonzentrationen als in ihrer Umgebung erhalten muß, kommt der Grenzschicht der Zelle eine besondere Bedeutung zu. Die Grenzschicht, die dem Bakterium seine Form gibt, den Stoffaustausch und dessen Regulation ermöglicht und ihm einen Schutz gegen Umwelteinflüsse gewährt, nennt man Zellhülle oder -wand.

Da sich diese Arbeit mit einem Aufnahmeproblem, der induzierbaren citratabhängigen Eisenaufnahme, bei einem Gram-negativen Bakterium, Escherichia coli, befaßt, soll hier auf drei Themen eingegangen werden.

1.1. Die äußere Membran als Permeationsbarriere

Die Bakterienzelle ist von einer cytoplasmatischen Membran umgeben. Dieser folgt nach außen hin eine einfache Mureinschicht bei Gram-negativen und eine mehrschichtige bei Gram-positiven Bakterien (113). Gram-negative Bakterien besitzen eine zweite Membran, die äußere Membran. Zwischen beiden Membranen ist der sog. periplasmatische Raum eingeschlossen. Hier befinden sich lösliche Proteine, darunter Hydrolasen und Bindeproteine (51, 52). Beide Membranen weisen den typischen Aufbau einer biologischen Membran auf: Zwei Lipid-

schichten, die auf Grund von physikalisch-chemischen Kräften so geordnet sind, daß die lipophilen Fettsäuren der amphipathischen Lipidmoleküle beider Schichten gegeneinander liegen und eine hydrophobe Phase bilden. Die hydrophilen Reste weisen nach außen. Während die innere Membran aus Phospholipiden besteht, werden diese bei der äußeren Lamelle der äußeren Membran teils durch Lipopolysaccharide ersetzt (79, 80). Letztere weist also eine starke Asymmetrie auf, die durch das Auftreten verschiedener Proteine noch verstärkt wird (12, 102).

Gerade in diesem Aufbau der Membran liegt ihre Funktion begründet. Während die langen hydrophilen Polysaccharidketten eine allgemeine sterische Abschirmung der Membranoberfläche und eine starke Abweisung gegen lipophile Substanzen (z.B. Antibiotica) bewirken (7, 9), stellt die Lipidphase der Membran eine für hydrophile Substanzen unüberwindbare Barriere dar (8, 22). Die grundsätzliche Barriere ist wahrscheinlich für eine selektive Aufnahme notwendig. Hierbei spielen die Proteine die Hauptrolle. Dies sind 3 - 5 Hauptproteine und um etwa 50 andere in der äußeren Membran von E. coli nachgewiesene (2, 12, 100).

Für manche Hauptproteine ist eine mehr oder weniger spezifische Porenfunktion nachgewiesen (98, 107, 108, 109). Deshalb werden sie auch Porine genannt. Sie erstrecken sich von der äußeren Seite der äußeren Membran bis zum Murein, mit dem sie nicht-kovalent gebunden sind. Daher wirkt die äußere Membran als Molekularsieb, das kleinere ungeladene hydrophile Zucker- und Peptidmoleküle mit einer Ausschlußgrenze von etwa 500 - 700 Dalton durchläßt (82). Als Beispiel für ein Porin sei das Matrix-Protein (43) von E. coli genannt (98). Äquivalente Porine wurden auch bei Salmonella typhimurium gefunden (83).

Das Lipoprotein von E. coli, das sowohl am Murein kovalent (6, 10) gebunden als auch nicht gebunden (54) vorkommt,

reicht wahrscheinlich nicht bis zur äußeren Membranoberfläche, da weder Porenfunktionen noch Phagen oder Colicine bekannt sind, die daran binden. Die Anzahl der sog. Nicht-Hauptproteine hängt stark von den Kulturbedingungen ab (70). Sie sind also durch Induktion/Repression regulierbar. So werden z.B. das 83K-, FepA- und Cir-Protein unter Eisenmangel synthetisiert (41, 76). Während für 83K noch keine Funktion bekannt ist, dient FepA als Rezeptor für Eisen-III-Enterochelin und Colicin B (45, 91) und Cir für die Colicine I und V (11, 12, 39, 45). TonA, Rezeptor des Ferrichroms, des Antibioticums Albomycin, der Phagen T1, T5 und Ø80 und des Colicins M (7, 8, 12, 40, 44, 46, 49), ist nur leicht durch den Eisengehalt des Mediums beeinflußbar (9). LamB, Rezeptor des Phagen λ, wird durch Maltose induziert und ist an deren Aufnahme beteiligt (11, 57, 105). Der Rezeptor des Bakteriophagen T6 und Colicins K, Tsx (42, 61), ist durch cAMP positiv (1) und ein Hauptprotein, III, negativ (74) regulierbar. Ferner sind Membranproteine bekannt, die durch Filtrierung der Zellen induzierbar sind (3).

Citrat induziert das citratabhängige Eisentransportsystem und ein Protein (FecA) in der äußeren Membran von E. coli, das wahrscheinlich als Rezeptor für den Eisen-Citrat-Komplex dient (41, 111).

Diese und andere Proteine verleihen der äußeren Membran eine gewisse Selektivität. Dennoch ist ein Spezifitätsproblem offensichtlich, da ein und dasselbe Protein mehr als ein Substrat binden kann. Spezifische und energieabhängige Translokationen werden durch die Permeasen der inneren Membran bestimmt, wo auch die Atmungskette und andere enzymatische Reaktionen lokalisiert sind.

1.2. Induktion

Die Induktion ist eine hervorragende Erfindung der lebenden Natur. Sie wurde bei vielen Organismen beobachtet und am Beispiel des Lac-Operons von E. coli weitgehend verständlich gemacht (56). Das Grundprinzip der Induktion besteht darin, daß die Zelle die genetische Information für die Synthese eines Proteins oder einer Gruppe von zusammenwirkenden Proteinen nur dann exprimiert, wenn diese benötigt werden. Dies wird von der Zelle durch den Kontakt mit einem Induktor (z. B. das Substrat für ein bestimmtes Enzym) erkannt. Am Beispiel des Lac-Operons wurde gezeigt, daß der Induktor (β-Galaktosid, Lactose, IPTG etc.) in die Zelle gelangt, und durch Bindung an einem Regulatorprotein (Repressor) wird dieser von der Operatorregion der DNA entfernt, so daß die RNA-Polymerase die Transkription starten kann. Drei Proteine werden synthetisiert, zwei davon sind in diesem Zusammenhang von Belang: Eine Permease in der Membran und eine Hydrolase im Zellinneren, die β-Galaktosidase.

Nun wurden zwei Klassen von Mutanten gefunden, die phänotypisch gleich waren. Sie wuchsen auf Lactose nicht, wenn sie in kleinen Konzentrationen angeboten wurde. Genauere Untersuchungen zeigten, daß es sich dabei um zwei genetisch unterschiedliche Mutanten handelt: Eine β-Galaktosidase-defekte Mutante, die Lactose akkumulierte, und eine Permease-defekte Mutante, in deren Zellextrakt hohe β-Galaktosidase-Aktivität zu finden war, wenn sie in Anwesenheit von sättigender (hoher) Induktorkonzentration angezogen war (17, 18).

Neben diesem Induktionsmodell, das in vielen induzierbaren Systemen verwirklicht ist, existiert noch ein im Detail jedoch nicht so weit erforschtes Modell, das eine Induktion von außen annimmt. Dies wird für die Induktion des Hexosephosphataufnahmesystems (HPS) durch Glucose-6-phosphat (G6P) (23, 30, 32, 51, 119, 120) und für die des Dicarbonsäureauf-

nahmesystems bei Azotobacter vinelandii (96) postuliert. Während 0,1 mM G6P im Außenmedium für die Induktion des HPS ausreichte, wurde durch 60 mM intrazellulär aus dem Glucosestoffwechsel akkumuliertes G6P keine Induktion gefunden (23, 51). Weitere Hinweise kamen aus der Induktionskinetik, die sich bezüglich der Autokatalyse, Aufrechterhaltung und der Abhängigkeit von der Induktorkonzentration im Medium gänzlich von der Kinetik der Induktion des Lac-Operons unterschied (120).

Der Mechanismus der Induktion von außen ist noch Gegenstand von Spekulationen. Dietz (23) faßte 5 solcher spekulativen Mechanismen folgendermaßen zusammen:

1. G6P bindet an ein Enzym, das sich in der Membran befindet und an der Innenseite eine Reaktion katalysiert, die zur Bildung des Regulators führt.
2. G6P bindet direkt an ein Makromolekül in der Membran, das direkt mit dem Repressor gekoppelt ist, was zur Derepression führt.
3. G6P geht eine Reaktion an der Außenseite der Membran ein, die zum vektoriellen Transport einer Reaktionskomponente von innen nach außen führt. Die Abnahme der Konzentration dieser Komponente in der Zelle kontrolliert die Induktion.
4. G6P fließt in ein Kompartiment in der Zelle unverändert ein, wo sich der Repressor, für intrazellulär gebildetes G6P nicht erreichbar, befindet (119).
5. Durch eine Reaktion mit einem Membranenzym wird G6P in den eigentlichen Induktor überführt, der vektoriell nach innen transportiert wird.

In dieser Arbeit stellt sich die Frage, wo das citratabhängige Eisentransportsystem unter den induzierbaren Systemen einzuordnen ist. Obwohl E. coli über alle Enzyme des Citronensäurezyklus verfügt, kann es auf Citrat als einziger C-

Quelle nicht wachsen (60). Zellfreie Extrakte von E. coli oxidieren Citrat (64). Deshalb wird angenommen, daß E. coli im Gegensatz zu vielen anderen Gram-negativen Enterobakterien und Gram-positiven (50, 59, 115, 116) kein Citrat aufnehmen kann. Ferner induziert E. coli das Enzym des "fermentativen Abbaus" von Citrat, die Citratlyase, wenn die Zellen auf Glucose und Citrat anaerob angezogen werden (114). Unter diesen Bedingungen kann E. coli ebenfalls nicht auf Citrat als einziger C-Quelle wachsen, weil ein weiteres Enzym, die Oxalacetatdecarboxylase, fehlt (71). Wie induziert das Citrat die citratabhängige Eisenaufnahme? Ist Citrat der eigentliche Induktor oder der Eisencitrat-Komplex oder ein Citratderivat? Wird die citratabhängige Eisenaufnahme unter anaeroben Bedingungen induziert? Diese Fragen sind unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

1.3. Eisenaufnahme

Die Bedeutung des Eisens im Zellmetabolismus und dessen geringe Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen bestimmen seine einzigartigen Aufnahmemechanismen bei Mikroorganismen. Wegen dessen Vorkommen in zwei Oxidationsstufen kann Eisen an Redoxreaktionen teilnehmen. So ist es essentiell für die Funktion von Cytochromen und mehreren anderen Proteinenzymen wie z.B. die Aconitase (37, 78), Nitratreduktase (38) und Schwefel-Eisenproteinen. Eisen bildet jedoch im neutralen pH-Bereich Aquohydroxy-Polymere mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 10^{-38} und im phosphathaltigen Medium schwer lösliche Eisenphosphatverbindungen (94). Auf diese Herausforderung reagieren Mikroorganismen mit der Synthese und Ausscheidung von Chelatoren mit hoher Fe^{3+}-Affinität, die nach Komplexierung des Eisens spezifisch wieder aufgenommen werden.

Verschiedene Pilzspezies produzieren unter Eisenmangel Komplexbildner der Hydroxamatgruppe wie Coprogen, Ferrichrom, Ferricrocin u. a. (14, 29, 118). Enterochelin ist der Eisenchelator der Enterobakterien E. coli, Salmonella typhimurium und Aerobacter aerogenes (produziert auch Aerobactin) (97, 122). Wie bereits erwähnt ist die Eisenenterochelinaufnahme rezeptorabhängig (FepA) und benötigt das FepB-Protein (wahrscheinlich eine Permease) und die tonB-Funktion für die energieabhängige Permeation durch die Cytoplasmamembran (20, 35, 45, 90,). Die Mobilisierung des Eisens aus dem Komplex erfolgt im Cytoplasma durch Spaltung des Enterochelins durch eine spezifische Esterase (fesB-Genprodukt) (97).

E. coli und S. typhimurium können das von Ustilago sphaerogena produzierte Ferrichrom als Eisenquelle verwenden (19, 28, 48). Seine Aufnahme ist vom TonA (Rezeptor) und tonB-Genprodukt abhängig. Als Mechanismus der Eisenmobilisierung aus dem Ferrichrom wird eine der tonA/tonB-abhängigen Translokation nachgeschaltete Reduktion des Fe^{3+} zu Fe^{2+} (durch eine Reduktase oder das Redoxpotential der Atmungskette in der Cytoplasmamembran) diskutiert. Der Dekomplexierung folgt eine Acetylierung des Ionophors und damit Herabsetzung seiner Affinität zum Eisen (48). Das modifizierte Ferrichrom wird dann eisenfrei ausgeschleust. Die Energetisierung beider Systeme, Ferrichrom (26, 27) und Enterochelin (92), erfolgt sowohl über phosphatgebundene als auch über Membranpotential-Energie.

E. coli kann schließlich neben einer niedrig-affinen chelator- und energieunabhängigen Eisenaufnahme auch hochaffin und energieabhängig über das induzierbare Citratsystem Eisen aufnehmen. Dieses System ist genetisch unabhängig von den anderen Systemen, teilt mit ihnen jedoch die Abhängigkeit vom tonB-Genprodukt. TonA- und alle bekannten Enterochelin-Mutanten können Eisencitrat aufnehmen. Der für die Eisencitrataufnahme verantwortliche fec-Genbereich bei ca. 6 Min.

ist gut getrennt vom ent-Gencluster bei 13 Min. und dem tonA-Gen bei 3 Min. (121).

Citratabhängige Eisenaufnahme wurde bei E. coli K12 und B/r, jedoch nicht bei E. coli W und S. typhimurium gefunden (34, 97, 122). Einige Pilze wie z.B. Neurospora crassa und Rhodotorula pilimanae können Eisen über Citrat aufnehmen. Neurospora scheidet Citrat (auch Succinat und Malat) unter Eisenmangelbedingungen aus und solubilisiert auf diese Weise das an der Zelloberfläche in Form von Hydroxypolymeren adsorbierte Eisen (117, 118). Im Falle von R. pilimanae ist es nicht ausgeschlossen, daß Citrat nur indirekt die Eisenaufnahme stimuliert, indem es das Eisen an den von diesem Organismus produzierte Chelator, Rhodotorulasäure, abgibt (14).

Einen interessanten Aspekt der Eisenversorgung von Bakterien durch Citrat liefert die antagonistische Wirkung des Eisencitrats zur bakteriostatischen Wirkung der eisenbindenden Proteine der Milch und des Serums (Lacto- bzw. Transferrin) (13). Eisen-Ammonium-Citrat erhöht die Virulenz von E. coli 0111 um das 100000fache und stimuliert das Wachstum von K12, einem avirulenten Stamm, in Mäusen. Eisensorbitol-Citrat erhöht die Infektiosität von E. coli für die Niere, während z. B. für Eisen-Dextran oder -Dextrin (MG: 180000 bzw. 230000) keine Virulenzerhöhung beobachtet wurde. Dies hängt sicherlich mit der Nutzbarmachung des Eisens für E. coli zusammen. Die interessante Frage stellt sich, warum gerade diese Enterochelinproduzenten unter diesen dereprimierenden Eisenmangelbedingungen z.B. des Serums nicht in der Lage sind, die bakteriostatische Wirkung des Transferrins aus eigener Kraft zu überwinden. Enterochelin ist auf jeden Fall konkurrenzfähiger gegen Transferrin (Dissoziationskonstanten der Eisenkomplexe 10^{-52} bzw. 10^{-36}) als Citrat.

In dieser Arbeit soll das citratabhängige Eisentransportsystem genauer charakterisiert werden. Es sollen Informationen gewonnen werden, die zur Aufklärung des Induktions- und Auf-

nahmemechanismus beitragen. Ein Aufnahmemechanismus, der das Citrat als Eisen-Überbringer zu einem Zelloberflächenrezeptor (FecA-Protein) vorsieht, wird auf Grund insignifikanter ^{14}C-Citrataufnahme (53) während des Eisentransports diskutiert. Auch eine Aufnahme des gesamten Komplexes und anschließende Ausschleusung von modifiziertem oder unverändertem Citrat sind denkbar. Ferner soll die Rezeptorabhängigkeit des Eisen-Citratsystems untersucht werden. Über den weiteren Weg des Eisens von der äußeren Membran bis ins Zellinnere ist wenig bekannt. Daher sollen Experimente angestellt werden, die die Rolle der periplasmatischen Proteine im Eisentransport aufklären.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Alle verwendeten, hier nicht aufgeführten Substanzen waren analysenreine Reagenzien der Firma E. Merck, Darmstadt.

cis-Aconitat	Sigma Chemie GmbH, St. Louis, USA
ADP	Boehringer GmbH, Mannheim
Albumin aus Rinderserum	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
ATP	Boehringer, s.o.
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA
Bacto-Trypton	Difco, s.o.
Biogel P-2 (200 - 400 mesh)	Bio-Rad-Laboratories, Richmond, Cal. USA
Casaminosäuren	Difco, s.o.
Chelex 100	Bio-Rad, s.o.
Chloramphenicol	Serva, s.o.
Citrat-Lyase	Boehringer, s.o.
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, s.o.
2,3-Dihydroxybenzoesäure	EGA Chemie AG, Steinheim/Albuch
Fluoroacetat	Serva, s.o.
Fluorocitrat	Calbiochem. San Diego, Cal. USA
Fluram	Hoffman-La Roche AG, Basel, Schweiz
Fumarat	Serva, s.o.
HEPES	Serva, s.o.
Isocitrat	Sigma, s.o.
Lactat-Dehydrogenase	Boehringer, s.o.
Lysozym	Boehringer, s.o.
Malat-Dehydrogenase	Boehringer, s.o.
NADH	Boehringer, s.o.
Nutrient Broth	Difco, s.o.

Pronase P aus Streptomyces griseus	Serva, s.o.
Test-Combination zur Citratbestimmung	Boehringer, s.o.
TMED	Serva, s.o.
Trikarballylat	Sigma, s.o.
Yeast Extract	Difco, s.o.

Die folgenden Radiochemikalien stammen von Radiochemical Centre, Amersham, England.

1,5-^{14}C-Citrat (20 mCi/mMol)
^{55}Fe-Eisenchlorid in o,1 m HCl (1,01 mCi/ml, 150 µg/ml)
^{14}C-Glutamin (49 mCi/mMol, 50 µCi/ml)
^{3}H-Prolin (677 mCi/mMol, 1 mCi/ml)

2.2. Nährmedien

Minimalsalze

CR-Salze:	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	15,7 g/l
	KH_2PO_4	3,0 g/l
	$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g/l
MQ-Salze:	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	7,5 g/l
	KH_2PO_4	3,0 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	NH_4Cl	1,0 g/l

EAM: (Mit einer Mischung aus 5 N NaOH und 5 N KOH (3 : 1) auf pH 6,9 einzustellen.)

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,07 g/l
KH_2PO_4	0,68 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	0,66 g/l
$MgCl_2$	0,5 ml 1 M/l
$CaCl_2$	0,2 ml 0,1 M/l

DM-Salze:	KH_2PO_4	3,0 g/l
	K_2HPO_4	7,0 g/l
	Na_3-Citrat·$2H_2O$	0,5 g/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g/l
	$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g/l

Komplexmedien

TY-Medium:	Bacto Tryptone	8,0 g/l
	Yeast Extract	5,0 g/l
	NaCl	5,0 g/l
NB-Medium:	Nutrient Broth	8,0 g/l
	NaCl	5,0 g/l

Alle Medien wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Zur Herstellung der jeweiligen Nährplatten wurde 15 g/l Agar zugegeben.

2.3. Versuchsorganismen

Escherichia coli K12 AB2847: aroB, thi, malA, tsx.
Folgende, aus diesem Stamm abgeleitete Mutanten wurden ebenfalls verwendet:

IR20: fepA
P8: tonA
BR158: tonB

E. coli K12 1004C: rha, fadA, but-12, lacI, supE-57, supF-58, ilv, metE, hemA

E. coli K12 AB259: thi, HfrH
icd: $icdA_3$, gltA

E. coli K12 AN260: thi, proA, argE, try, pheA, tyrA, aroB, fepB
AN299: wie AN260, jedoch fec anstatt fepB.

2.4. Zusammensetzung des Minimalmediums für AB2847

Minimalsalzlösung (5fach konzentriert)	20 ml
Tryptophan-, Tyrosin-, Phenylalaninlösung (je 1 mg/ml)	10 ml
p-Aminobenzoesäure-, p-Hydroxybenzoesäure-lösung (2 mM)	2 ml
Glucose (40%) bzw. andere C-Quelle	1 ml
Na-Citrat (100 mM)	1 ml
Thiaminlösung (1 mg/ml)	1 ml
$MgSo_4$-Lösung (1 M)	0,1 ml
$CaCl_2$-Lösung (0,1 M)	0,1 ml
$FeCl_3$-Lösung (1 mM in 0,1 M HCl gelöst)	variabel

Auf 100 ml mit sterilem bidestilliertem Wasser auffüllen.

Grundsätzlich wurde das Eisen aus den Minimalsalzen und der Glucose extrahiert. Wenn die Induktion des Eisen-Citratsystems unerwünscht war, wurde das Citrat durch 5-20 µM DHB ersetzt. Abweichende C-Quellen werden an den entsprechenden Stellen erwähnt.

Andere auxotrophe Stämme erhielten die benötigten Aminosäuren in einer Konzentration von 0,1 mg/ml.

2.5. Glaswaren- und Medienvorbehandlung

2.5.1. Behandlung der Glaswaren

Alle Kultur- und Aufnahmegefäße wurden gründlich mit 10 mM EDTA und 6 mal mit bidestilliertem Wasser gespült.

2.5.2. Extraktion des Eisens aus Salz- und Glucoselösungen

CR-, M9- und Eisenaufnahmepuffer wurden 10fach konzentriert über Chelex100-Säulen gegeben und als 5fach konzentrierte Lösungen aufgefangen, um den Eisengehalt der Medien zu mini-

mieren. Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden erst nach der Extraktion in den entsprechenden Konzentrationen den Medien zugefügt.

40%ige Glucoselösungen wurden ebenfalls durch Chelex100-Säulen extrahiert.

2.6. Kulturbedingungen

2.6.1. Aerobes Wachstum

Vorkultur: Auf TY-Agarplatten gewachsene Zellen wurden direkt in 10 ml M9-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelbad angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und zum Animpfen der Hauptkultur verwendet.

Hauptkultur: Das Medium für die Hauptkultur bestand aus den gleichen Bestandteilen mit dem Unterschied, daß die Eisenquelle (Citrat oder DHB) je nach Zweck des Experimentes verändert wurde. Unter den gleichen Bedingungen wie bei der Vorkultur wuchsen die Zellen in diesem Medium mindestens 4 Generationen lang und wurden bei einer optischen Dichte von ca. 0,5 geerntet. Eine OD_{578} von 1,0 entspricht einer Bakterienmasse von 0,38 mg/ml oder einer Zellzahl von 10^9 pro ml.

2.6.2. Anaerobes Wachstum

Die anaerobe Anzucht der Zellen erfolgte im GasPak-System der Firma BBL, Division of Becton, Dickinson and Co., Cockeysville, Md. USA (Anaerobier-Topf) bei 37 °C unter Magnetrührung im Brutschrank. Anaerobe Kulturen erhielten stets je 1 µM Na_2SeO_3 und Na_2MoO_4. Wenn Nitrat als Elektronenakzeptor zugesetzt wurde, dann war es 1% im Medium (66, 73). Die Zellen wurden bei einer OD_{578} von ca. 0,4 geerntet. Um eine eventuelle Induktion des Eisen-Citratsystems durch aerobes Wachstum

in der Zeit zwischen dem Öffnen des Anaerobier-Topfes und dem Entfernen des Wachstumsmediums zu verhindern, wurde der Topf ca. 30 Minuten lang gekühlt, bevor er geöffnet wurde. Dann wurde die Ernte rasch eingeleitet. Die Zellen wurden in vorgekühlten Zentrifugengläsern bei 4 °C kurz (5 Min.) abzentrifugiert.

2.7. Testplatten

2.7.1. Für aroB-Stamm (AB2847)

Um diesen Stamm auf Kontamination zu testen, wurden M9-Agarplatten mit Zusatz der aromatischen Aminosäuren (Tyr, Trp, Phe, pABS, pHBS) gegossen und weitere Platten ohne diese für das Wachstum von aroB-Mutanten essentiellen Wuchsstoffe. 0,1 ml der zu testenden Kultur wurde auf je eine Platte der beiden Arten ausgestrichen und für 24 oder 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Wachstum auf den aromatenfreien Platten zeigt Kontamination an.

2.7.2. Für hemA-Mutante (A1004C)

M9-Agarplatten mit 0,4% Succinat als C-Quelle, den auxotrophen Aminosäuren Met, Ile und Val (je 20 µg/ml) und entweder mit oder ohne δ-Aminolävulinsäure dienten zum Test der hemA-Mutante auf Reversion. Ohne δ-Aminolävulinsäure wächst dieser Stamm auf Succinat als C-Quelle nicht.

2.7.3. Für Wachstum stimulierende oder hemmende Substrate

1 ml TTC (20 mg/ml Äthanol) und 1 ml AB2847-Zellsuspension (OD_{578}= 1,3) wurden 100 ml M9-Agar zugegeben und in 10 ml-Portionen in Petri-Schalen eingegossen. In diesen Platten

wurden Löcher (6 mm Durchmesser) eingestanzt. Die zu testenden Substanzen wurden in bestimmten Mengen (bis zu 20 µl bekannte Konzentration) in die Löcher einpipettiert. Die Wachstumsstimulierung war an roten trüben Höfen (Wachstumshöfen) und die Hemmung an klaren Hemmhöfen erkennbar.

2.8. Verdünnungsexperiment

Um, von dem zu variierenden Faktor (Citratkonzentration) abgesehen, genau gleiche Ausgangsbedingungen zu garantieren, wurden 400 ml M9-Medium ohne Citrat zusammenpipettiert. Aus diesem Medium wurden 50 ml entnommen, in einen 500 ml-EM-Kolben steril gegeben und nach Zusatz von 1 mM Citrat mit einer Vorkultur von AB2847 so angeimpft, daß die Kultur eine Anfangs-OD_{578} von 0,05 hatte. Diese induzierte Stammkultur wurde nach Messung der citratabhängigen Eisenaufnahme nach 2.9 zum Animpfen der nächsten Kultur mit einer Citratkonzentration von 0,1 mM verwendet. Nach 4 Generationen wurde die Eisenaufnahme gemessen und eine neue Kultur mit niedrigerem Citratgehalt angeimpft, usw..

2.9. Transportmessungen

Exponentiell wachsende Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit eisenextrahiertem EAM bei 4 °C gewaschen, zu einer bestimmten optischen Dichte (ca. 0,5) im gleichen Medium resuspendiert und bis zur Durchführung der Transportexperimente auf Eis gehalten. Dem Eisentransportansatz wurden 100 µM NTA, um das niedrigaffine Transportsystem zu unterdrücken, und, wenn nichts anderes angegeben ist, 0,1% Glucose als C-Quelle zugesetzt. Die Ansätze wurden 5 Minuten bei 37 °C und 180 Upm in einem Gyratory-Schüttelbad vor dem Start inkubiert.

Die zu testenden Komplexbildner (Citrat, Desferri-Ferichrom, DHB etc.) wurden ca. 30 Min. mit dem radioaktiven $^{55}FeCl_3$ inkubiert, bevor der Transport gestartet wurde. 10 ml-Ansätze wurden mit 200 µl ^{55}Fe-Citrat (10 nMol ≙ 0,7 µCi; Citrat 10 µMol), 107 µl ^{55}Fe-Ferrichrom (10 nMol ≙ 0,7 µCi; Ferrichrom 10 nMol), 200 µl ^{55}Fe-DHB (10 nMol ≙ 0,7 µCi; DHB 0,2 µMol), 100 µl ^{3}H-Prolin (1 mM, 10 µCi/ml) oder 100 µl ^{14}C-Glutamin (1 mM, 5 µCi/ml) gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurden 0,5 ml- oder 1 ml-Proben entnommen, über Zellulosenitrat-Membranfilter (Typ BA85;0,45 µm) der Firma Schleicher und Schüll, Dassel, in einer Absaugvorrichtung (Hölzel-Technik, Dorfen, Obb.) abgesaugt und zwei Mal mit je 4 ml 0,1 M LiCl-Lösung gewaschen. Zu den getrockneten Filtern wurden je 5 ml Rotiszint-Szintillator-Flüssigkeit (Carl Roth KG, Karlsruhe) gegeben und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Mark II, Nuclear-Chicago) gemessen. Unter Verwendung der optischen Dichte der Zellsuspensionen wurden die Cpm-Werte in nMol/mg Trockengewicht ausgedrückt.

Die ^{14}C-Citrataufnahme wurde mit an den entsprechenden Stellen angegebenen Konzentrationen einer Stammlösung der spezifischen Aktivität 20 mCi/mMol (oder mit "kaltem" Citrat verdünnt) gestartet. Dabei wurden Zelluloseacetat-Filter (OE67; 0,45 µm; Schleicher u. Schüll) verwendet und der LiCl-Lösung 10 mM Citrat zugesetzt, um die unspezifische Adsorption auf den Filtern zu reduzieren.

2.10. Extraktion von Zellen durch Kochen

10 ml Zellsuspension (ca. 1,2 x 10^9 Zellen/ml) wurden nach 1 Std. Inkubation mit 1 mM ^{14}C-Citrat (0,6 µCi) unter Wachstumsbedingungen auf ein Membran-Filter (Porendurchmesser 0,45 µm) gegeben und 1 Mal mit 4 ml 0,1 M LiCl-Lösung gewaschen. Das Filter wurde in ein im kochenden Wasser gehalte-

nes Reagenzglas mit 1 ml kochendem bidestilliertem Wasser gebracht, kräftig geschüttelt und für 30 Min. weiter gekocht. Anschließend wurden die gekochten Zellen abzentrifugiert (11500 Upm, SS34, Sorvall). Die Radioaktivität des Filtrats, des in 100 µl H_2O aufgenommenen Sediments und des Überstands wurde gezählt. Filtrat und Überstand wurden für weitere Bestimmungen aufbewahrt.

2.11. Dünnschichtchromatographische Identifizierung von Citrat

Nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C-Citrat wurden in bestimmten Zeitintervallen 1 ml-Proben entnommen und über Membranfilter (OE67; Schleicher u. Schüll) gegeben. Das Filtrat wurde in ein Reagenzglas in einer Saugflasche abgefangen und die Radioaktivität von 0,05- oder 0,1 ml-Proben nach Zusatz von 5 ml "Quickszint 402" im Szintillationszähler bestimmt. Zur Identifizierung der Radioaktivität im Medium wurde ein Zellulose-Dünnschichtchromatographie-System (Zellulose-Schichtdicke = 0,1 mm; Merck) mit einem aus Diäthyläther : Ameisensäure : H_2O = 7 : 2 : 1 zusammengesetzten Laufmittel eingesetzt (81). Es wurden je 20 µl aufgetragen, und nach einer Laufstrecke von 15 cm wurde das Chromatogramm getrocknet und im DC-Scanner II (Fa. Berthold) das Citrat durch Vergleich mit einer Kontrolle (im gleichen Medium ohne Zellen) identifiziert.

Als weitere Identifizierungsmethode der geringen Radioaktivität (z.B. ^{14}C-Citrat im Zellextrakt) wurde die Autoradiographie verwendet. Das getrocknete Dünnschichtchromatogramm wurde einem Röntgenfilm, der durch kurze Belichtung sensibilisiert wurde, exponiert, und beide wurden in eine Alu-Folie gewickelt und bei -70 °C für 2 Monate in der Dunkelheit aufbewahrt. Dann wurde der Film entwickelt und die Radioaktivität als Schwärzung identifiziert.

2.12. Enzymatische Citratbestimmung

2.12.1. Präparation von Zellextrakten für die intrazelluläre Citratbestimmung

Exponentiell wachsende Zellen (OD_{578} = 0,5) wurden aus 50 - 100 ml Kultur durch kurze Abzentrifugation (4 Min. bei 5000 Upm in Christ-Minifuge) geerntet. Nach Abdekantieren des Mediums wurde das Sediment in 1 - 2 ml eiskalte 0,3 M $HClO_4$-, 1 mM EDTA-Lösung aufgenommen, gut auf dem Vortex-Mixer gemischt, in ein vorgekühltes 15 ml-Zentrifugenglas transferiert und auf Trockeneis oder in flüssigen Stickstoff gestellt (10 Min.). Danach wurde die Suspension auf Eis/Wasser aufgetaut. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert (10000 x g, Sorvall), der Überstand wurde quantitativ entnommen und mit einer entsprechenden Menge 6 M K_2CO_3 neutralisiert. Das entstandene $KClO_4$ wurde durch Zentrifugation aus der Probe entfernt. Die Proben wurden anschließend zur Bestimmung des Citratgehaltes verwendet oder bis zur Bestimmung im flüssigen Stickstoff eingefroren.

2.12.2. Testansatz und Durchführung

Prinzip:

$$\text{Citrat} \xleftrightarrow{\text{Citrat-Lyase}} \text{Oxalacetat} + \text{Acetat}$$

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + H^+ \xleftrightarrow{\text{MDH}} \text{Malat} + NAD^+$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xleftrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + NAD^+$$

Die Abnahme der NADH-Konzentration, gemessen an der Abnahme der Extinktion bei 340, 365 oder 334 nm, ist ein Maß für die umgesetzte Citratmenge. Citratlyase (Citrat-Oxalacetat-Lyase, EC 4.1.3.6) ist spezifisch für Citrat. Substanzen des Tricarbonsäurezyklus und verwandte Metabolite werden nicht umgesetzt (21).

Der enzymatische Test wurde entweder nach (21) oder mit folgender Zusammenstellung nach (4) durchgeführt:
(Gesamtvolumen 3,02 ml)

	Leerwert	Probe	Endkonzentration
Lösung 1:	1,0 ml	1,0 ml	
- Glycylglycinpuffer (pH 7,8)			
- MDH			3,75 U/ml
- LDH			7,84 U/ml
- NADH			166 µg/ml
Bidest. H_2O	2,0 ml	1,8 ml	
Probelösung	--	0,2 ml	4 - 80 µg Citrat/ml

mischen, nach ca. 5 Min. Extinktion der Lösungen messen (E_1), Reaktion starten durch Zugabe von

Lösung 2:			
- CL	0,02 ml	0,02 ml	0,265 U/ml

mischen, nach Ablauf der Reaktion (ca. 5 Min.) Extinktionen der Lösungen messen (E_2).

Für Berechnung siehe (4, 21). Die Eichkurve der Abb. 1 zeigt den linearen Bereich des Tests.

2.13. Zellaufschluß mit der French-Presse

500 ml Zellsuspension der OD_{578} = 0,5 wurden nach zweimaligem Waschen in 5 - 10 ml Hepes-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und in der im Eis vorgekühlten "French pressure cell press" bei 1000 inch Druck aufgebrochen. Die verbliebenen ganzen Zellen wurden bei 5000 x g (4 °C, 10 Min.) abzentrifugiert. Der Überstand wurde 90 Min. in der Ultrazentrifuge (50000 rpm, Rotor 75 Ti) zentrifugiert. Das Sediment (Membranfraktion) wurde noch einmal gewaschen und in bidest. Wasser aufgenommen.

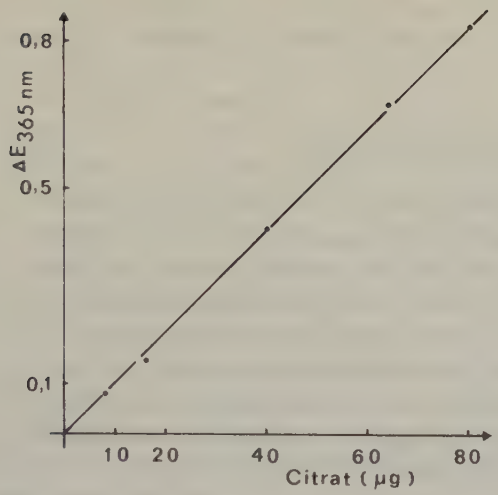


Abb. 1: Eichkurve der Citratbestimmung

2.14. Behandlung der Zellen mit Pronase

Exponentiell wachsende Zellen (OD_{578} = 0,5) wurden wie unter 2.9 geerntet, in EAM (pH 7) gewaschen und 20fach konzentriert im gleichen Medium aufgenommen, dem zuvor 5 mg Pronase/ml zugesetzt worden war. Diese Suspension wurde bei 37 °C 30 Min. lang im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf das ursprüngliche Volumen gebracht, indem sie 1 : 20 in EAM verdünnt wurde, und die optische Dichte gemessen. Wenn nicht anders angegeben, wurde die auf diese Weise erhaltene Zellsuspension direkt in den Aufnahmeexperimenten (siehe 2.9) eingesetzt.

Wenn die Proteine der äußeren Membran mit Pronase behandelter Zellen untersucht werden sollten, wurden die Zellen im Anschluß an diese Behandlung und vor der Einleitung der Membrantrennungsprozedur 6 Mal in Hepes-Puffer (pH 7,5) oder

Saline gewaschen, um die Pronase zu entfernen und so eine Verdauung an den isolierten Membranen zu verhindern.

2.15. Bestimmung der Überlebensrate (24)

Eine exponentielle Kultur wurde in zwei Teile geteilt: Ein Teil wurde mit Pronase wie in 2.14 behandelt, 2 Mal in Saline gewaschen und auf eine bestimmte optische Dichte (ca. 0,5) verdünnt. Der andere Teil wurde gleich behandelt jedoch ohne Zusatz von Pronase. Die Gesamtkeimzahl beider Suspensionen wurde durch Zählung in der Neubauer-Kammer bestimmt, der Verdünnungsfaktor wurde so berechnet, daß am Ende einer Verdünnungsreihe etwa 2000 Zellen/ml erhalten wurden. Jede Verdünnungsstufe wurde auf dem Whirlmix gut durchmischt.

Auf 3 TY-Agarplatten (mit der gleichen Schichtdicke, 17,5 ml Agar) wurden 0,05 ml der letzten Verdünnungsstufe (ca. 100 Zellen) gegeben und mit Drigalski-Spatel (der mit Alkohol an einer Gasflamme abgeflammt und am Agar abgekühlt wurde) gut und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien gezählt.

Für die Berechnung der Überlebensrate der behandelten Zellen wurde die Lebendkeimzahl der unbehandelten Zellen als 100% angenommen.

Alle Schritte wurden steril durchgeführt. Pronase wurde in sterilem EAM gelöst, um die Kontaminationsgefahr zu verringern.

2.16. Osmotischer Schock (52) und Aufnahmetest mit geschockten Zellen

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} = ca. 0,5) wurden bei 4 °C geerntet und 3 Mal mit 0,01 M Tris-HCl/0,03 M

NaCl (pH 7,1) gewaschen. Die Zellen wurden einer milden osmotischen Schockprozedur nach Heppel unterworfen. Sie wurden abzentrifugiert und in 70 ml 0,03 M Tris-HCl bei 24 °C resuspendiert. Unter Rühren wurden das gleiche Volumen 40 proz. Sucroselösung in 0,03 M Tris-HCl (Sucrose-Endkonzentration 20%; Zell-Naßgewicht ca. 0,25 g), anschließend 0,02 ml 100 mM EDTA (Endkonzentration 0,1 mM) dazugegeben und 10 Min. im Schüttelbad bei ca. 180 Upm und 24 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in der Sorvall-Zentrifuge 10 Min. bei 13000 x g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment am Becherboden verteilt und schnell 20 ml eiskalte 0,5 mM $MgCl_2$-Lösung zugegeben. Nach 10 Min. Schütteln im Eisbad wurden die geschockten Zellen von der Schockflüssigkeit durch Zentrifugation (10000 x g, 4 °C) getrennt. Das Sediment wurde in 5% Sucrose-EAM-Lösung (pH 6,9) resuspendiert, einmal gewaschen und schließlich in das gleiche Medium zu einer OD_{578} von 0,5 aufgenommen.

Diese Suspension wurde in Transportexperimenten verwendet. Diese unterschieden sich von denen mit ganzen Zellen darin, daß die LiCl-Lösung zusätzlich 5% Sucrose zur Stabilisierung der geschockten Zellen enthielt. Prolin- und Glutaminaufnahme wurden stets mitgetestet. Die Ergebnisse wurden nur dann verwertet, wenn der Glutamintransport deutlich gehemmt, der Prolintransport jedoch erhalten worden war.

2.17. Membrantrennung (86)

Die Bakterienzellen wurden bis einer OD_{578} von ca. 0,5 in M9-Medium und den entsprechenden Zusätzen (z.B. Citrat, Fluorocitrat) angezogen. Anschließend wurden sie abzentrifugiert und in 10 mM Tris/0,75 M Sucrose (pH 7,8) resuspendiert. Dazu wurde Lysozym (10 µg/ml) gegeben, und nach 2 Min. Inkubation bei 0 °C wurde die Zellsuspension auf das doppelte Volumen in 1,5 mM EDTA, pH 8 verdünnt. Die Sphäroplasten wurden

mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach Entfernung der restlichen ganzen Zellen (Zentrifugation bei 2000 x g) wurden die Membranen bei 80000 x g und 4 °C 1,5 Stunden zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,25 M Sucrose, 3,3 M Tris, 1 mM EDTA (pH 7,5) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Membranen wurden in 25% Sucrose, 5 mM EDTA (pH 7,5) resuspendiert. Die eigentliche Membrantrennung erfolgte auf einem Sucrose-Gradienten mit den Konzentrationen 55, 50, 45, 40, 35 und 30% in 5 mM EDTA, pH 7,5. Bei 25000 x g und 4 °C wurde über Nacht (ca. 14 Stunden) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die einzelnen Banden wurden mit einer Spritze vorsichtig abgehebert, in bidest. Wasser aufgenommen und 90 Min. bei 80000 x g sedimentiert. Die Membranen wurden in bidest. Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.18. Protein- und Peptidbestimmung mit Fluram

Die Proteinlösung wurde in 1,5 ml 0,2 M Natriumborat-Puffer (pH 9,0) unter Schütteln auf dem Mixer mit 0,5 ml einer frisch angesetzten Fluramlösung (3mg in 10 ml Dioxan) schnell gemischt. Für Peptidlösungen wurde ein 0,2 M Borat- oder Phosphatpuffer mit pH 8,0 verwendet. Die Fluoreszenz wurde in einem Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzaufsatz 1030 bei den Anregungswellenlängen 405 + 436 nm abgelesen. Vor jeder Bestimmung wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (1 - 100 µg) erstellt.

2.19. Gelelektrophorese (62, 69)

Es wurden aus einem Trennungs- und einem Konzentrierungsgel bestehende Slab-Gele von 1,5 mm Dicke und 12 cm Länge angefertigt.

Das Trennungsgel enthielt 11% Acrylamid und 0,2% Methylen-Bisacrylamid in 0,375 M Tris mit 0,2% SDS, pH 8,8. Die Polimerisation wurde durch Zugabe von 0,02% Ammoniumpersulfat und 0,02% TEMED gestartet.

Das Konzentrierungsgel enthielt 3% Acrylamid, 0,08% Methylen-Bisacrylamid und 0,1% SDS in 0,125 M Tris, pH 6,8. Die Polimerisation wurde wie oben eingeleitet.

Es wurden auch Gele verwendet, die im Trennungsgel 0,075% anstatt 0,2% Methylen-Bisacrylamid enthielten (41).

Die Proteine (1 - 5 mg/ml) wurden in einer Lösung aus 2% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-Mercaptoäthanol und 0,001% Bromphenolblau in 0,0625 M Tris 5 Min. lang gekocht und anch Abkühlen in 5 bis 20 µl-Portionen aufgetragen. Die Trennung wurde unter Verwendung eines aus 0,192 M Glycin und 0,1% SDS in 0,025 M Tris, pH 8 bestehenden Elektrophoresepuffers bei Raumtemperatur und konstanter Stromstärke (20 bzw. 15 mA) durchgeführt.

Wenn die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau, in 50% Methanol und 10% Essigsäure gelöst, gefärbt. Die Gele wurden mit einer Essigsäure-Methanollösung (7,5% bzw. 5%) entfärbt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Induktion des citratabhängigen Eisentransportsystems

Zellen von E. coli K12 bilden bei Wachstum mit Citrat im Medium ein Citrat-abhängiges Eisentransportsystem. Die im Folgenden dargestellten Experimente sollen über die Induktionsbedingungen informieren und zur Abklärung des Induktionsmechanismus beitragen.

3.1.1. Untersuchungen über die Spezifität des Citratsystems

3.1.1.1. Induktorspezifität des Citratsystems

Mehrere Substanzen wurden auf ihre Eignung für die Induktion des citratabhängigen Eisentransportsystems untersucht. Dies geschah, indem E. coli AB2847 im M9-Medium mit Glucose als C-Quelle und der zu untersuchenden Substanz (1 mM) unter Eisenmangelbedingungen angezogen wurde. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden geerntet und auf Eisenaufnahme in Abhängigkeit von 1 mM Citrat getestet (siehe 2.9).

Von den getesteten Substraten, darunter Zwischenprodukten des Tricarbonsäurezyklus und Molekülen mit Citrat-ähnlicher Struktur, konnte lediglich Fluorocitrat eine citratabhängige Eisenaufnahme induzieren. In Abb. 2 sind einige repräsentative Kurven dargestellt, die die citratabhängige Eisenaufnahme bei E. coli AB2847 nach Wachstum in Anwesenheit verschiedener Testsubstanzen zeigen. Weitere Informationen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Isocitrat, cis-Aconitat, Trikarballylat, Malat, Oxalacetat, Fumarat, Tartarat, Succinat, Pyruvat, Lactat und Oxalat hatten keinerlei induzierende Wirkung auf das Citratsystem. Diese Substanzen eignen sich auch nicht als verwertbare Eisenchelatoren, d. h. sie induzieren keine eigenen Eisentransportsysteme (Tabelle 1, 4. Spalte). Wenn jedoch Fumarat

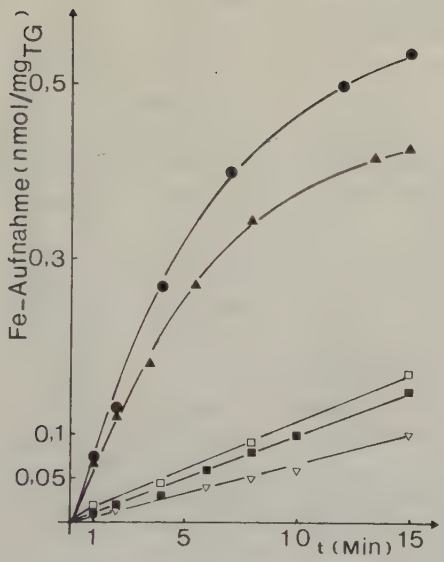


Abb. 2: Induktorspezifität des citratabhängigen Eisentrans- transportsystems. Die Citrat-abhängige Eisenaufnahme wurde bei Zellen vom Stamm AB2847 gemessen, die in extrahiertem M9-Medium mit Glucose als C-Quelle in Gegenwart von jeweils 1 mM Citrat (●), Fluorocitrat (▲), Trikarballylat oder Isocitrat (□), cis-Aconitat (■) und Fumarat (▽) (Oxalacetat und Succinat entsprechen Fumarat, nicht gezeigt) gewachsen waren. Im Aufnahmetest waren: 1 mM Citrat, 0,1 mM NTA, 0,1% Glucose und 1 µM $^{55}Fe^{3+}$.

und manchmal Trikarballylat als Chelatoren verwendet werden, wird hohe ^{55}Fe-Aktivität auf dem Filter wiedergefunden. Dies ist im Falle von Fumarat eindeutig als Adsorption (infolge von Ausfällung des Eisens?) zu interpretieren, weil bereits nach einer Minute genau so hohe Aktivität wie nach 10 Minuten zu finden ist (siehe Abb. 3). Mit Trikarballylat beträgt die Adsorption nach einer Minute mehr als 50% der Aktivität nach

Tabelle 1: Eisenaufnahme bei dem Stamm AB2847 nach Wachstum in Anwesenheit verschiedener Induktoren in eisenextrahiertem Medium.
Die Induktorkonzentration war 1 mM.

Induktor	Eisenaufnahme in nMol/mg Tg. in 10 Min. in Anwesenheit von			bei citratinduzierten Zellen
	1 mM Citrat+ + 0,1 mM NTA	0,1 mM NTA	1 mM Induktor++ + 0,1 mM NTA	
Citrat	0,45	0,1	0,45	0,45
Fluorocitrat	0,43	0,1	0,17	0,16
Isocitrat	0,16	0,14	0,21	0,07
cis-Aconitat	0,1	0,075	0,2	0,18
Trikarballylat	0,1	0,1	0,15-0,45	0,1-0,4
Malat	0,07	0,05	0,17	0,15
Oxalacetat	0,11	0,09	0,08	0,04
Fumarat	0,06	--	0,4	0,4
Tartarat	0,08	--	0,2	0,24
Succinat	0,08	--	0,04	0,04
Pyruvat	0,07	0,05	0,05	0,05
Lactat	0,09	0,08	0,08	0,08
Oxalat	0,05			

+Vergleiche auch Abb. 2 ++Vergleiche auch Abb. 3

10 Minuten (siehe Abb. 3). Außerdem sind die Kurven mit Trikarballylat nicht reproduzierbar (Tabelle 1). Ferner war das Wachstum von E. coli AB2847 mit Fumarat und Trikarballylat sowie mit Oxalacetat, Succinat und Tartarat jeweils als einzige Eisenquelle sehr langsam (nicht gezeigt). Dies spricht dafür, daß diese Substanzen nicht nur keine Eisenversorgung stimulieren, sondern vielmehr das Eisen irgendwie in eine nicht verwertbare Form überführen.

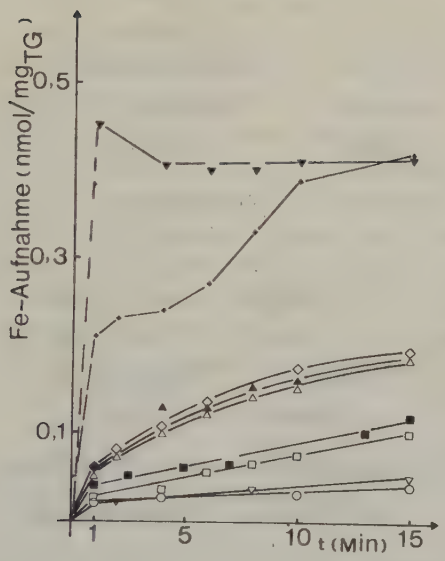


Abb. 3: Ligandenspezifität des Citratsystems. Eisenaufnahme bei AB2847 nach Wachstum in Anwesenheit von 1 mM Citrat. Transportansätze waren wie in Abb. 2, jedoch anstatt Citrat enthielten sie folgende Substanzen von jeweils 1 mM Konzentration: Fluorocitrat oder Malat (△), Isocitrat (□), cis-Aconitat (▲), Trikarballylat (+), Fumarat (▼), Oxalacetat (▽), Succinat (○), Tartarat (◇) und ohne Zusatz (■).

Die OH-Gruppe am C_3-Atom des Citrats und Fluorocitrats scheint von entscheidender Bedeutung für ihre Funktion als Induktoren zu sein; denn Isocitrat, cis-Aconitat und Trikarballylat, die sich lediglich durch die OH-Gruppe von Citrat unterscheiden (Abb. 4), induzieren das Citrat-abhängige Eisentransportsystem nicht.

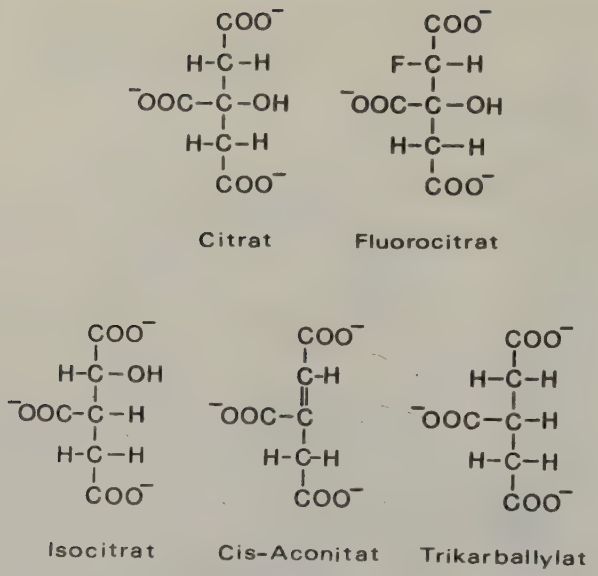


Abb. 4: Strukturformel von Citrat, Fluorocitrat, Isocitrat, cis-Aconitat und Trikarballylat.

3.1.1.2. Ligandenspezifität des Citratsystems

Nachdem festgestellt wurde, daß unter den getesteten Substanzen allein Citrat und Fluorocitrat das Citratsystem induzieren, sollte hier getestet werden, ob das eine oder das andere dieser Moleküle das Citrat im Eisenaufnahmeprozeß bei mit 1 mM induzierten Zellen ersetzen kann. Abb. 3 und Tabelle 1 zeigen, daß dies nicht der Fall ist. Die hohe Adsorption mit Fumarat und Trikarballylat wurde bereits in 3.1.1.1 diskutiert. Fluorocitrat kann, obwohl es induzierend wirkt, im Transporttest das Citrat weder bei mit Citrat noch bei mit Fluorocitrat induzierten Zellen ersetzen. Dies zeugt von einer hohen Spezifität des Citratsystems für Citrat als Kom-

plexbildner. Einen weiteren Hinweis auf die Rolle von Fluorocitrat als Induktor und gegen seine Rolle bei der Eisenaufnahme liefern Wachstumsexperimente auf Eisenmangel-M9-Platten. Die Zugabe von 20 µl 1 mM Citrat in ein Loch (6 mm ∅) in einem mit der aroB-Mutante inokulierten M9-Agar (20 µM an DHB) stimulierte das Wachstum (Wachstumshof), die Zugabe von Fluorocitrat dagegen nicht. Mit Fluorocitrat war aber auch keine Hemung zu erkennen. Waren die Platten 200 µM an Citrat, wurde ein Wachstumshof beobachtet, wenn 20 µl 1 mM Fluorocitrat in der gleichen Weise wie oben zugesetzt wurden. Die Wachstumstimulierung im letzteren Fall ist auf eine Kooperation zwischen Fluorocitrat als Induktor und Citrat als Induktor und Eisentransportvehikel zurückzuführen.

3.1.1.3. Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Induktion durch Fluorocitrat und Citrat

Mit exponentiell wachsenden Zellen des Stammes AB2847, die ohne Induktor angezüchtet worden waren, wurde der zeitliche Verlauf der Induktion in Anwesenheit von je 1 mM Fluorocitrat bzw. Citrat 60 Minuten lang durch Messung der aufgenommenen ^{55}Fe-Aktivität verfolgt. Die Abb. 5A zeigt nach ca. 20 Minuten eine Beschleunigung der Eisenaufnahme in Gegenwart von Citrat. Diese Beschleunigung bleibt im Fluorocitrat-haltigen Ansatz jedoch aus, und die Eisenaufnahme bleibt niedrig und nimmt einen linearen Verlauf an. Chloramphenicol zeigte keinen Einfluß auf den Verlauf der Induktionskurve mit Fluorocitrat. Dagegen lag die Eisenaufnahme in Gegenwart des Proteinsyntheseinhibitors und Citrats unter dem Niveau der Eisen-NTA-Aufnahme, weil der Eisen-Citrat-Komplex bei nicht induzierten Zellen eine zusätzliche Eisenfalle neben dem NTA-Komplex darstellt. Der Unterschied zwischen beiden Induktoren ist nur dadurch zu erklären, daß Fluorocitrat das Citratsystem nur induziert aber als Ligand im Komplex mit Eisen das System für die Eiseneinschleusung nicht benut-

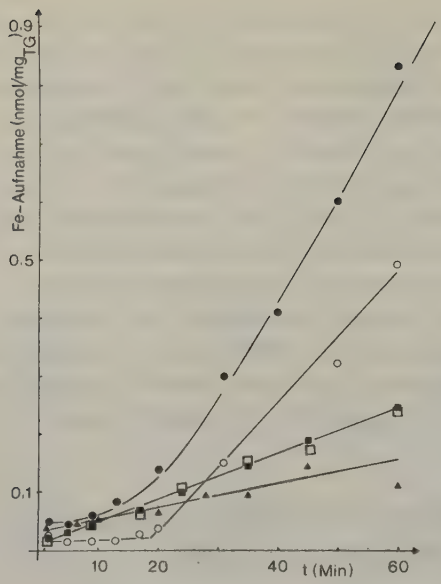


Abb. 5A: Zeitlicher Verlauf der Induktion des Citrat-abhängigen Eisentransports. Exponentiell wachsende Zellen wurden geerntet und in EAM mit allen zum Wachstum von aroB-Zellen (AB2847) benötigten Zusätzen resuspendiert und 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Alle Ansätze enthielten 0,1 mM NTA und 0,2% Glucose. Zum Zeitpunkt Null wurde die Aufnahme mit 1 µM $^{55}Fe^{3+}$ und entweder 1 mM Citrat (●) oder 1 mM Fluorocitrat (■) gestartet. Die Ansätze (▲) und (□) wurden mit 50 µg CAN/ml inkubiert und mit 1 mM Citrat bzw. 1 mM Fluorocitrat gestartet. (○) Eisen-citrat-aufnahme nach Korrektur mit der Aufnahme in Gegenwart von 0,1 mM NTA.

zen kann. Abb. 5B zeigt, daß die mit Fluorocitrat gezüchteten Zellen Eisen nur in Anwesenheit von Citrat aber nicht von Fluorocitrat aufnahmen. Mit Fluorocitrat und Chloramphenicol inkubierte Zellen zeigten keine Eisenaufnahme mit Citrat als Komplexbildner.

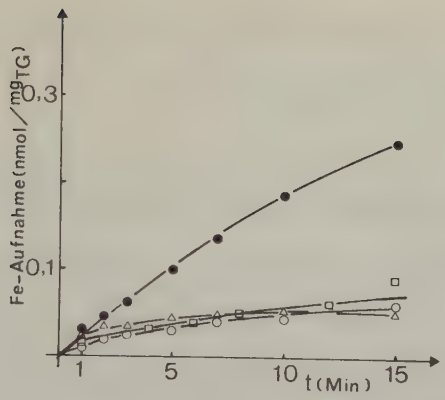


Abb. 5B: Induktion des citratabhängigen Eisentransports durch Fluorocitrat. Eisentransport bei E. coli AB2847 nach einer Verdoppelung in Gegenwart von 1 mM Fluorocitrat im Wachstumsmedium. Die Aufnahmeansätze enthielten: (●) 1 mM Citrat, (□) 1 mM Fluorocitrat, (△) 0,1 mM NTA und (○) 1 mM Citrat. Der letzte Ansatz wurde mit Zellen durchgeführt, die mit 1 mM Fluorocitrat und 50 µg CAN/ml eine Verdoppelungszeit lang inkubiert worden waren.

Der Modus der Induktion des Citratsystems durch Fluorocitrat erinnert an den der Induktion der β-Galaktosidase bei den Permeasemangelmutanten, den sogenannten "cryptic mutants" (56). In beiden Fällen werden die Zellen in die Lage versetzt, einen Induktor potentiell zu akkumulieren. Der Induktor z.B. IPTG (Isopropylthiogalaktosid) wird im zweiten Fall nicht akkumuliert, weil eben die Permease fehlt. Man erkennt die Induktion des Lac-Operons der "cryptic mutants" an der β-Galaktosidaseaktivität. Im hier untersuchten Fall nimmt man die Induktion erst dann wahr, wenn den Zellen das Eisen mit Citrat angeboten wird. Daß ^{55}Fe-markiertes Fluorocitrat während der Induktion nicht akkumuliert und keine Hemmung des Wachstums von AB2847 durch die für die Akonitase toxische Verbindung (siehe Diskussion) beobachtet wurde, legt den Verdacht, daß E. coli eine natürliche cryptische Mutante für Fluoroci-

trat darstellt. Um die Induktion des Citrat-abhängigen Eisentransports durch Fluorocitrat zu erklären, muß man demnach eine Induktion von außen fordern.

3.1.1.4. Induktion des FecA-Proteins durch Fluorocitrat

Der Induktor des Eisen-Citrattransports, Citrat, induziert ein Protein in der äußeren Membran von E. coli K12, das sog. FecA (früher cit-Protein) (41). Daher war es interessant zu erfahren, ob Fluorocitrat das Protein ebenfalls induziert. Abb. 6 zeigt ein Elektropherogramm der äußeren Membranfraktion (gewonnen nach Osborn) aus IR20-Zellen (fepA), die in Anwesenheit von Citrat oder Fluorocitrat in M9-Medium gewachsen waren. Der Abbildung ist zu entnehmen, daß 0,5 mM Fluorocitrat das FecA-Protein genau so gut induziert wie 1 mM Citrat.

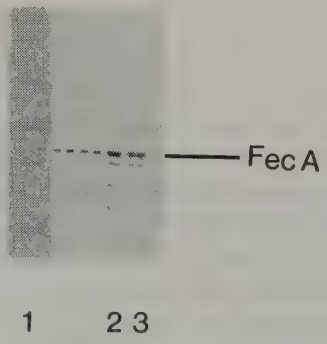


Abb. 6: Induktion des FecA-Proteins der äußeren Membran von IR20 durch Citrat und Fluorocitrat. Aliquots der äußeren Membran (ca. 30 µg Protein) von IR20-Zellen, die in M9-Medium mit 0,4% Glucose (1) und mit entweder 0,5 mM Fluorocitrat (2) oder 1 mM Citrat (3) gewachsen waren, wurden auf SDS-Polyacrylamid-Gel (0,2% Methylen-Bisacrylamid) wie in 2.19 beschrieben aufgetragen und elektrophoretisiert.

3.1.2. Schicksal des Citrats während der Induktion

Ob Citrat von E. coli aufgenommen wird oder nicht, ist eine entscheidende Frage für die Entwicklung einer Vorstellung vom Mechanismus der Induktion des Citrat-abhängigen Eisentransportsystems und des Eisentransports selbst. Schon 1923 fand Koser, daß E. coli im Gegensatz zu Enterobacter aerogenes Citrat als einzige C-Quelle nicht verwerten kann (60). Da E. coli unter aeroben Bedingungen einen funktionierenden Citronensäurezyklus und von daher die Voraussetzung für den Abbau von Citrat besitzt, ist das Versagen der Zellen, Citrat zu verwerten, ohne Annahme einer Eindringungsresistenz der Zellhülle gegen das Substrat schwer verständlich. Die folgenden experimentellen Befunde sollen Auskunft über die Citrataufnahme unter Bedingungen der Induktion des citratabhängigen Eisentransportsystems (Wachstum) sowie unter denen der Eisenaufnahme (ohne Wachstum) geben.

3.1.2.1. Citrataufnahme bei wachsenden Zellen

An Zellen von AB2847, die in Ab- oder Anwesenheit von Citrat gezüchtet waren, wurde die Citrataufnahme unter Wachstumsbedingungen (1,5-^{14}C-)Citrat mit der Filtriermethode studiert. Dies sollte dazu dienen, eventuelle Unterschiede zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen bezüglich der Citrataufnahme zu erfassen. Aufnahmeexperimente mit 10 µM, 50 µM und 1 mM Citrat mit oder ohne 1 µM $FeCl_3$ und 0,1 mM NTA in An- oder Abwesenheit von Chloramphenicol zeigten keine signifikante ^{14}C-Citrataufnahme, die mit der Eisenaufnahme in Korrelation gebracht werden könnte. Die filtergebundene Aktivität schwankte unspezifisch zwischen 0,3 und 1,1% der eingesetzten Radioaktivität. In diesem Bereich lag sie auch, wenn analoge Kontrollexperimente mit Puffer allein oder mit Zusatz von durch Erhitzen abgetöteten Zellen durchgeführt wurden. Diese unspezifische Bindung konnte durch Zusatz von

10 mM "kaltem" Citrat zum Waschmedium auf weniger als 0,07% gesenkt werden. Die Werte schwankten zwischen 0,023 und 0,064% im zellfreien Puffer mit einem Mittelwert von 0,035% des eingesetzten radioaktiven Citrats, was bedeutet, daß 90 - 95% der Aktivität durch Citrat entfernbar ist. Damit die ^{14}C-Citrataufnahme mit der ^{55}Fe-Citrataufnahme während der Induktion direkt verglichen werden kann, wurden Experimente mit 1 mM ^{14}C-Citrat, 1 µM $FeCl_3$ und 0,1 mM NTA unter Wachstumsbedingungen durchgeführt, und es wurde dem Waschmedium kein Citrat zugefügt. Die Ergebnisse dieser Experimente waren nicht reproduzierbar, und die auf den Filtern gefundenen Radioaktivitäten schwankten unregelmäßig zwischen 0,056 und 0,363% (0,56 - 3,63 nmol) in einem Experiment und zwischen 0,026 und 0,095% (0,264 - 0,959 nmol) in einem anderen, um nur zwei Beispiele zu geben. Die Werte waren nicht mit der Inkubationszeit und damit auch nicht mit der Zunahme der Zellmasse korrelierbar. Nach Abzug des durch Citrat entfernbaren Teils der Aktivität variierten die Werte zwischen 0,003 und 0,02%, was weniger als 0,001 nMol Citrat pro ml filtrierte Zellsuspension entspricht. Im Vergleich dazu wurden 0,132 und 19,5% der eingesetzten Eisenaktivität nach einer bzw. nach 60 Minuten aufgenommen, was der Kinetik der Abb. 5A (3.1.1.4) zu entnehmen ist. Dies zeigt, wie schwierig es ist, das Problem der Induktion mit dieser Methode zu bearbeiten. Auf jeden Fall ist der Hintergrund an Citrataktivität zu hoch und unregelmäßig, um eine Aussage über die Citrataufnahme zu machen. Allerdings kann man diese Befunde so formulieren, daß das Aufnahmeverhalten des Eisens während der Induktion sich von dem des Citrats gänzlich unterscheidet. $^{55}Fe^{3+}$-Eisen wird nämlich akkumuliert, ^{14}C-Citrat dagegen nicht. Citratdiffusion in die Zelle ist jedoch auf Grund der hohen unspezifischen Bindung (Adsorption) nicht auszuschließen.

3.1.2.2. Verfolgung der ^{14}C-Aktivität im Medium und Identifizierung des Citrats auf DC-Platten

Eventuelle Aufnahme, Abbau und Entweichung der ^{14}C-Aktivität als CO_2 konnten im Abschnitt 3.1.2.1 nicht ausgeschlossen werden. Die Ausdehnung der Experimente über 9 Stunden unter Bestimmung der Gesamtradioaktivität und der des Mediums nach Entfernen der Zellen durch Filtration sollte über Abnahme oder Konstanz der Radioaktivität, die dann mit $^{14}CO_2$-Entwicklung korrelierbar wäre, Aufschluß geben. Ein weiterer Aspekt war festzustellen, ob Citrat verändert wird, und ob Spaltprodukte aus dem Medium isoliert werden können.

Abb. 7 zeigt, daß die Gesamtradioaktivität der Zellsuspension konstant blieb. Folglich ist eine meßbare CO_2-Entwicklung unwahrscheinlich. Die Schwankungen der ^{14}C-Aktivität des Mediums sind relativ größer als die der Zellsuspension. Dies ist auf die in 3.1.2.1 ausführlich diskutierten Schwankungen in der Adsorption an das Filter und an die Zellen zurückzuführen. Es wurde jedoch keine abnehmende Tendenz der Mediumaktivität beobachtet, die auf Akkumulation in die Zellen schließen ließe.

Abb. 8 zeigt, daß die aus dem Medium isolierte Radioaktivität mit ^{14}C-Citrat identisch ist. Dies bedeutet, daß keine Spaltprodukte und keine sonstige Veränderung von Citrat während der Inkubation mit E. coli AB2847 feststellbar waren. Das wird auch in Abb. 9 bestätigt. In diesem Experiment wurde versucht, die nach einer Stunde ^{14}C-Citrataufnahme mit den Zellen assoziierte ^{14}C-Markierung zu extrahieren und dünnschichtchromatographisch zu identifizieren. Die geringe Radioaktivität (260 cpm/ml, siehe auch Legende zur Abb. 9) war jedoch mit der Methode der Autoradiographie nicht meßbar. Dies stimmt mit der geringen Citrataufnahme überein.

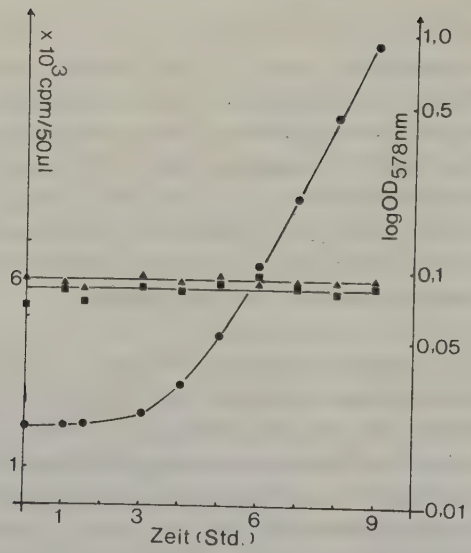


Abb. 7: Verteilung der ^{14}C-Citratradioaktivität zwischen zellfreiem Medium und Zellen während des Wachstums von AB2847 in M9-Medium + 1 mM Citrat (1,2 x 10^5 cpm/µMol Citrat). (▲) ^{14}C-Aktivität in 50 µl Zellsuspension, (■) ^{14}C-Aktivität in 50 µl Medium nach Entfernen der Zellen durch Filtration und (●) Wachstum von E. coli AB2847 im gleichen Experiment.

Die Wiederholung dieser Versuche unter Verwendung von durchgehend markiertem Citrat in geringeren Konzentrationen und dem Vergleich unterschiedlich markierter Citrate könnte einen besseren Aufschluß über Aufnahme und Katabolismus geben.

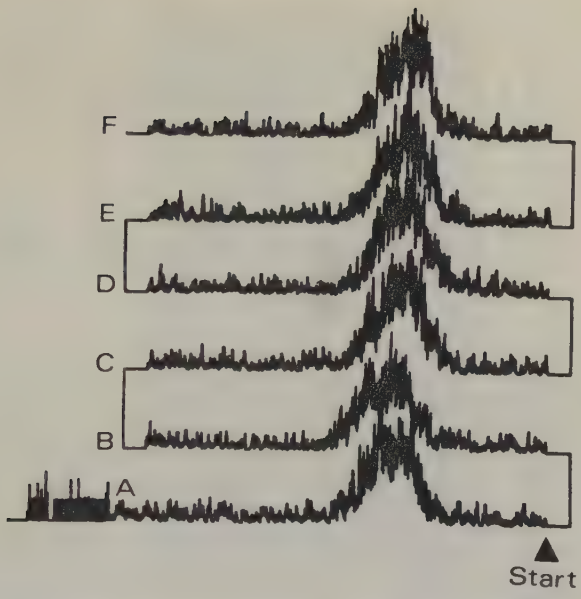


Abb. 8: Laufverhalten von ^{14}C-Citrat auf Zellulose-DC vor (A) und nach Inkubation mit AB2847-Zellen unter Wachstum in M9-Medium für 10 (B), 60 (C), 120 (D), 180 (E) und 270 Min. (F). Die Zellen wuchsen in dieser Zeit von OD = 0,06 bis OD = 1,36 (nach 270 Min.). Das Wachstumsmedium war 1 mM an Citrat (0,06 µCi/µmol Citrat) und 1 µM an $FeCl_3$. Probengewinnung und Auftragen (2500 cpm/20 µl) sowie Entwicklung des Chromatogramms erfolgten nach der in 2.11 beschriebenen Methode.

3.1.2.3. Citrataufnahme bei nicht wachsenden Zellen

Einigermaßen reproduzierbare Aufnahmekurven konnten bei nicht wachsenden Zellen, denen niedrige Citratkonzentrationen im Aufnahmetest angeboten wurden, erzielt werden. Das Angebot von 1 mM Citrat (^{14}C-markiert) ergab eine hohe Adsorption, die zwar durch Waschen mit "kaltem" Citrat erniedrigt werden konnte, jedoch mit hohen Schwankungen behaftet blieb.

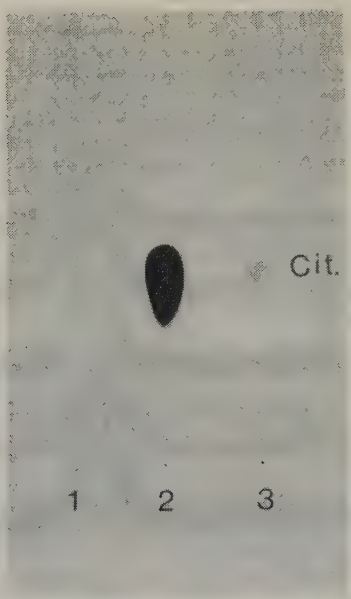


Abb. 9: Autoradiographie eines Dünnschichtchromatogramms von ^{14}C-Radioaktivität eines Zellextraktes von AB2847-Zellen (1), die 1 Stunde mit 1 mM Citrat (0,06 µCi/µMol) in M9-Medium von OD = 0,65 bis OD = 1,26 inkubiert worden waren, von ^{14}C-Citrat in H_2O gelöst (20 µCi/µMol) (2) und vom ^{14}C-Citrat des Mediums nach der Inkubation mit AB2847 (3). Auf die DC-Platte wurden in der Reihenfolge 20 (ca. 52 cpm) 2,5 und und 5 µl (ca.530 cpm) der Aliquote aufgetragen. Zellextraktion und Chromatogrammentwicklung erfolgten nach den in 2.10 bzw. 2.11 beschriebenen Methoden.

Da eine niedrigere Citrataufnahme in Gegenwart von Glucose beobachtet wurde (53), wurde hier die Citrataufnahme unter Verwendung anderer C-Quellen im Vorwachstum und im Aufnahmetest gemessen. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß kein spezifischer Einfluß den verschiedenen C-Quellen zuzuordnen ist.

In Abb. 10 sind einige Kurven dargestellt, die die ^{14}C-Citrataufnahme bei auf Glycerol gewachsenen Zellen unter Be-

Tabelle 2: ^{14}C-Citrataufnahme bei nicht wachsenden AB2847-Zellen. Die Aufnahmeexperimente wurden wie unter 2.9 beschrieben durchgeführt. Spezifische Aktivität des eingesetzten Citrats war 20 µCi/µMol.

Vorwachstum C-Quelle	Citrat	Zusätze zu dem Aufnahmetest C-Quelle	^{14}C-Citrat	Fluoro-citrat	Fluoro-acetat	Citrataufnahme (nMol/mg Tg. in 20 Minuten)
0,4% Glyzerin	10 mM:	0,05% Glyzerin	10 µM	--	--	0,065
		0,05% Glyzerin	10 µM	0,4 mM	--	0,07
		0,05% Glyzerin	10 µM	0,2 mM	--	0,047+
		0,1% Glucose	10 µM	0,2 mM	--	0,05+
0,4% Glyzerin	0,2 mM:	0,1% Glyzerin	12,5 µM	--	0,1 mM	0,1 ± 0,05
0,4% Pyruvat	1 mM:	0,1% Pyruvat	25 µM	--	0,1 mM	0,118
		0,1% Pyruvat	25 µM	--	--	0,144
		--	25 µM	--	--	0,06
0,1% Pyruvat	5 mM:	0,1% Pyruvat	25 µM	--	--	0,04
		--	25 µM	--	--	0,09
		0,1% Glucose	25 µM	--	--	0,04
0,4% Lactat	1 mM:	0,1% Lactat	25 µM	--	--	0,05
		--	25 µM	--	--	0,06
0,4% Glucose	1 mM:	0,1% Glucose	25 µM	--	--	0,045
		--	25 µM	--	--	0,092

+0,1% NaN_3 wurden dem Waschmedium zugefügt.

dingungen, die keinen Abbau des aufgenommenen Citrats erlauben sollten, zeigen. Die Inkubation der Zellen mit Fluorocitrat sollte den Abbau von Citrat während des Tests verhin-

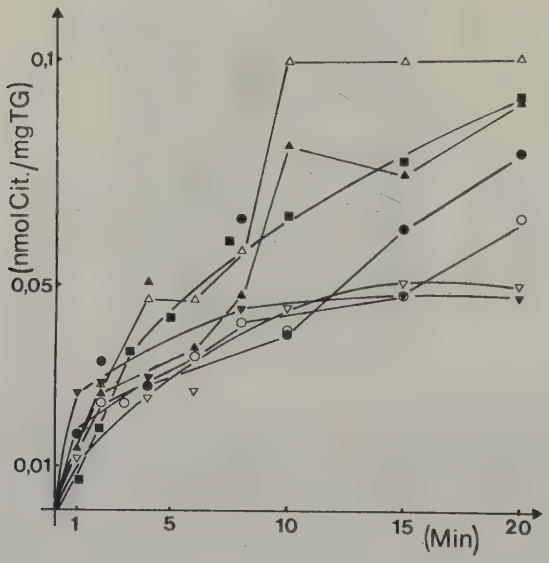


Abb. 10: ^{14}C-Citrataufnahme bei E. coli AB2847 nach Wachstum in M9-Medium mit Glycerol als C-Quelle und 10 mM Citrat. Die Aufnahmeexperimente wurden mit Zellsuspensionen in EAM ohne die auxotrophen Aminosäuren (kein Wachstum während des Tests) durchgeführt. Alle Ansätze wurden mit 10 µM ^{14}C-Citrat (20 µCi/µMol) gestartet. Die Filter wurden mit 0,1 M LiCl/10 mM Citrat gewaschen. (■) ohne C-Quelle, (○) 5 mM Glycerol als C-Quelle und (●) 5 mM Glycerol und 6 Min. Inkubation mit 0,4 mM Fluorocitrat vor dem Start. Folgende Ansätze wurden mit einer 0,1% NaN_3-haltigen Lösung nach Zugabe über die Filter gewaschen: (▽) 30 Min. mit 0,2 mM Fluorocitrat inkubiert, als C-Quelle 0,1% Glucose, (▼) 30 Min. mit 0,2 mM Fluorocitrat inkubiert, als C-Quelle 5 mM Glycerol, (△) ohne Fluorocitrat, 5 mM Glycerol als C-Quelle und (▲) 3 Min. mit 0,2 mM Fluorocitrat, 5 mM β-Glycerol- P .

dern, vorausgesetzt, daß ersteres aufgenommen wurde. Die Filter wurden mit 0,1% Natriumazid gewaschen, um den Abbau bis zur Trocknung der Filter und Zählung der Radioaktivität zu verhindern. Alle diese Maßnahmen brachten keine Erhöhung der Citrataufnahme über die ohne sie gefundene hinaus. Die niedrige Aufnahme (unter 0,1 nmol Citrat/mg Tg. nach 20 Min.) und ihre Unabhängigkeit von der C-Quelle (Energiequelle) lassen auf eine einfache unspezifische Diffusion schließen, die bei hoher Citratkonzentration im Test durch Adsorption maskiert wird.

3.1.3. Intrazelluläres Citrat induziert das citratabhängige Eisentransportsystem nicht

Da keine signifikante Akkumulation von radioaktiv markiertem Citrat in die Zellen von AB2847 gemessen werden konnte, schien es interessant, den intrazellulären Citratgehalt von induzierten, in Gegenwart von 0,1 mM Citrat angezüchteten, und nicht induzierten Zellen zu vergleichen. Dies sollte einerseits die Frage nach dem Einfluß des konstanten Citratpools auf die Induktion und andererseits nach dem Einfluß des Wachstums in Anwesenheit von Citrat auf die Poolgröße beantworten.

Die Citratkonzentration wurde in durch Extraktion mit Perchlorsäure gewonnenen Aliquoten von exponentiell wachsenden Zellen mit Hilfe des spezifisch Citrat-spaltenden Enzyms Citrat-Lyase bestimmt (siehe 2.12) und mit der Voraussetzung, daß das intrazelluläre Wasser 2,5 mg pro mg Trockengewicht (= 2,5 µl/mg Tg.) beträgt (68), auf das innere Zellwasser bezogen.

Aus Tabelle 3 ersieht man, daß die intrazelluläre Citratkonzentration bei induzierten und nicht induzierten AB2847-Zellen in etwa gleich ist. Auf jeden Fall trug das von außen

Tabelle 3: Intrazellulärer Citratgehalt in mM Citrat.

Stamm	Wachstumsbedingungen				
	Glucose	Glucose + 0,1 mM Citrat	Glucose + F-Acetat	Glucose + F-Citrat	Acetat
AB2847	5	4,3	10,5	4,7	--
AB259	1,85	--	--	--	2,61
icd	2,48	--	--	--	11,83

angebotene Citrat nicht zur Vergrößerung des inneren Pools bei. Außerdem ist die interne Citratkonzentration bei nicht induzierten ohne Citrat gewachsenen Zellen 50 mal größer als die minimale (0,1 mM) bzw. 5 mal als die optimale (1 mM) für die Induktion von außen erforderliche Citratkonzentration. Die icd-Mutante, die nach Helling bis zu 22 mM Citrat beim Wachstum auf Acetat als C-Quelle akkumuliert (63), hatte in dieser Arbeit eine intrazelluläre Citratkonzentration von 11,83 mM. Abb. 11 zeigt eine Stimulierung des Eisentransports durch Citrat bei Zellen, die 1 mM Citrat im Vorwachstum erhielten, gegenüber Zellen, die ohne Zugabe von Citrat wuchsen. Dies liefert einen Hinweis darauf, daß auch solche Zellen mit höherer intrazellulärer Citratkonzentration auf das im Medium angebotene Citrat angewiesen sind, um das Citratsystem zu induzieren. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, das Enterochelin-System bei dieser icd-Mutanten durch zusätzliche Mutationen zu blockieren, um eine bessere Untersuchung des Citratsystems zu ermöglichen. Eine sehr wichtige Frage könnte dann behandelt werden, indem man versucht, die Ausschleusung des intern gestauten Citrats ins Medium zu ermöglichen und die Auswirkungen auf die Induktion zu untersuchen.

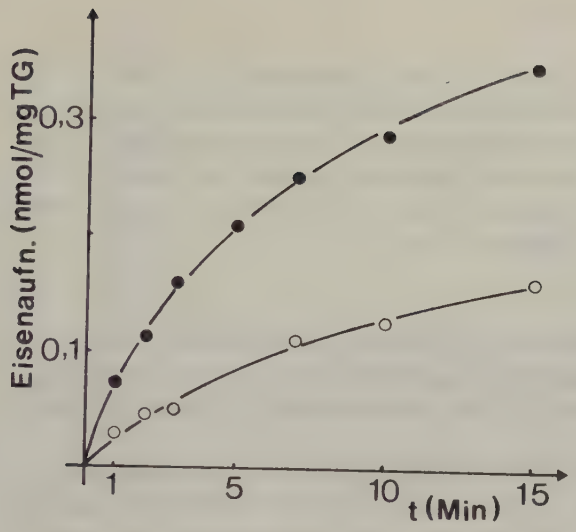


Abb. 11: Citratabhängige Eisenaufnahme bei E. coli AB259 icdA nach Wachstum in M9-Medium und 0,2% Acetat als C-Quelle (○) und mit Zusatz von 1 mM Citrat (●).

3.1.4. Aufrechterhaltung der Induktion

Die Aufrechterhaltung eines induzierbaren Systems mit suboptimalen Induktorkonzentrationen gibt eine positive Antwort auf die Frage, ob die Permeation des Induktors im Induktionsprozeß eingeschlossen ist (17). Die Aufnahme des Induktors ist nur dann von Bedeutung, wenn dessen Wirkort im Zellinneren liegt.

Bei der Lactose-Verwertung induziert der in die Zelle gelangte Induktor unter anderem seine Permease, die ihrerseits die Zelle zur Aufnahme weiterer Moleküle des Induktors und dessen Akkumulation bzw. Abbau befähigt. Dieses Phänomen

nennt man Autokatalyse.

Es wurde im folgenden die Frage untersucht, ob auch der Induktor über das citratinduzierbare Eisentransportsystem in die Zelle aufgenommen wird. Ist dies der Fall, würden nach Expression des Transportsystems geringere Citratkonzentrationen zu seiner Aufrechterhaltung ausreichen als für dessen Primärinduktion notwendig sind.

3.1.4.1. Ausverdünnung des Eisen-Citrattransportsystems beim Wachstum im citratfreien Medium - oder die Notwendigkeit der Daueranwesenheit des Induktors

Die citratabhängige Eisenaufnahmerate bei induzierten AB 2847-Zellen nimmt im Laufe des Wachstums ohne Citrat ab und erreicht nach der dritten bis vierten Generation ein niedriges Niveau (Abb. 12), das mit der Aufnahmerate nicht induzierter Zellen vergleichbar ist. Dies bedeutet, daß das citratabhängige Eisentransportsystem in Abwesenheit des Induktors ausverdünnt wird und keine Neusynthese stattfindet. Die fortwährende Anwesenheit von Citrat im Medium ist demnach notwendig für die Induktion und ihre Aufrechterhaltung. In dieser Eigenschaft stimmt das Eisen-Citrattransportsystem mit anderen induzierbaren Systemen (z.B. Lac-Operon) überein.

3.1.4.2. Auch die Aufrechterhaltung des Eisen-Citrattransportsystems verlangt hohe Citratkonzentrationen

3.1.4.2.1. Initialinduktion bei verschiedenen Citratkonzentrationen

Die Eisenaufnahmeraten der Tabelle 4 zeigen, daß erst ab einer Konzentration von 0,1 mM Citrat im Wachstumsmedium

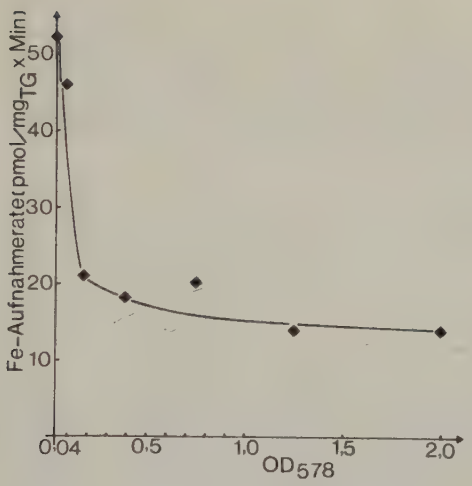


Abb. 12: Ausverdünnung des Citratsystems bei Wachstum ohne Citrat. Mit 1 mM Citrat induzierte E. coli AB2847-Zellen wurden abzentrifugiert und steril in ein frisches M9-Medium ohne Citrat überimpft. Bei den angezeigten optischen Dichten wurden Proben entnommen, gewaschen und in EAM resuspendiert. Die citratabhängige Eisenaufnahme wurde gemessen und aus der Aufnahme in 10 Minuten wurde die Aufnahmerate bestimmt.

das citratabhängige Eisentransportsystem induzieren kann. Kleine Konzentrationen dagegen sind nicht induzierend. Dieser Befund wurde durch Wachstumsexperimente unterstützt. Das Wachstum in Anwesenheit von 5 - 50 µM Citrat in flüssigen Medien wurde gegenüber citratfreiem Medium nicht stimuliert (Kurven nicht gezeigt). Daraus ergibt sich ein Hinweis auf das Fehlen einer autokatalytischen Eigenschaft des Eisen-Citratsystems. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß es sich um ein scheinbares Fehlen der Autokatalyse handelt, das

Tabelle 4: Citratabhängige Eisenaufnahme bei E. coli AB2847 nach Wachstum in M9-Medium (eisenextrahiert), das die angegebenen Citratmengen zur Induktion des Citratsystems enthielt. Die Aufnahme wurde in EAM mit folgenden Zusätzen gemessen: 1 mM Citrat, 1 µM $^{55}FeCl_3$, 0,1 mM NTA und 0,1% Glucose. Die Aufnahmerate wurde aus der 10-Minuten-Kinetik errechnet.

Citrat im Medium (mM)	Eisenaufnahmerate (pMol/mg Tg. x Min.)
--	10 ± 3
0,005	10 ± 3
0,01	11,5
0,02	14
0,1	60 ± 5
1,0	53 ± 7

auf einen möglichen Verbrauch des Induktors, Weiterwachstum ohne Induktor und ein daraus resultierendes Ausverdünnen des Systems zurückzuführen wäre. Auf Grund der hohen Citrat- und der geringen Zellkonzentration ist es jedoch unwahrscheinlich, daß der Induktor verbraucht wurde (siehe auch Abb. 13).

3.1.4.2.2. Aufrechterhaltende Citratkonzentrationen

Abb. 13 zeigt die Aktivität des Eisen-Citrattransportsystems vollinduzierter AB2847-Zellen nach Überimpfen in induzierende (1 mM und 0,1 mM Citrat-haltige) Medien und in Medien mit niedrigen Citratkonzentrationen (0,01 und 0,005 mM). Ferner wird die Initialinduktion nicht induzierter Zellen in Gegenwart von ausreichendem Citrat (1 mM) und nicht ausreichendem (0,005 mM) über mindestens vier Generationen verfolgt. Daraus ist zu entnehmen, daß die Aufnahmeaktivität der induzierten Zellen nur bei den höheren Citratkonzentrationen 1 mM

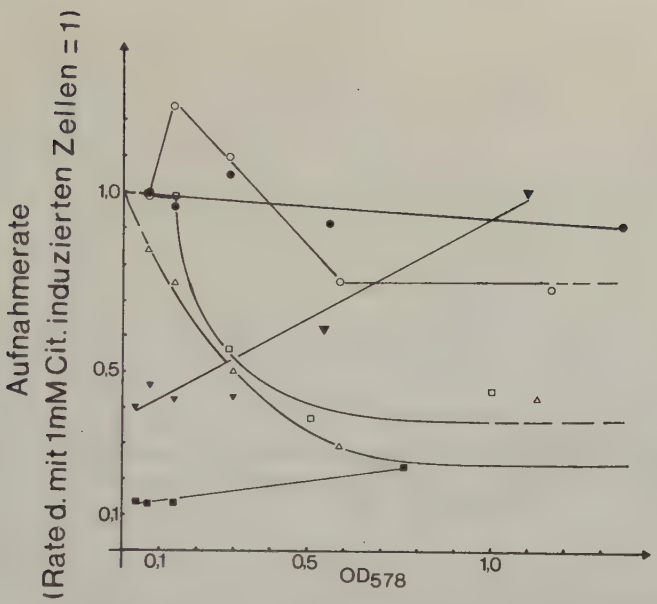


Abb. 13: Induktion des Eisen-Citrattransportsystems. Mit 1 mM induzierte Zellen, die mit (●) 1 mM Citrat, (○) 0,1 mM, (□) 0,01 mM und (△) ohne Citrat weitergezüchtet wurden. Erstinduktion mit 1 mM (▼) und mit 0,005 mM (■) Citrat.

und 0,1 mM, die normalerweise für Initialinduktion ausreichen, aufrechterhalten blieb. Bei den Konzentrationen 0,01 und 0,005 mM, die keine Initialinduktion einleiten können, nahm die Aufnahmeaktivität bis zur vierten Generation ab und blieb auf einem niedrigen Niveau ähnlich den induzierten Zellen nach Überimpfen in citratfreies Medium (3.1.4.1). In Abb. 14 wird die Auswirkung der sukzessiven Verdünnung induzierter Zellen in Medien mit abnehmender Citratkonzentration (1 mM bis 0) auf die citratabhängige Eisenaufnahmeaktivität demonstriert. Die Zellen wurden jeweils für vier Generationen in Gegenwart der angegebenen Citratkonzentration angezogen. Dann wurden Proben entnommen, und die Eisen-

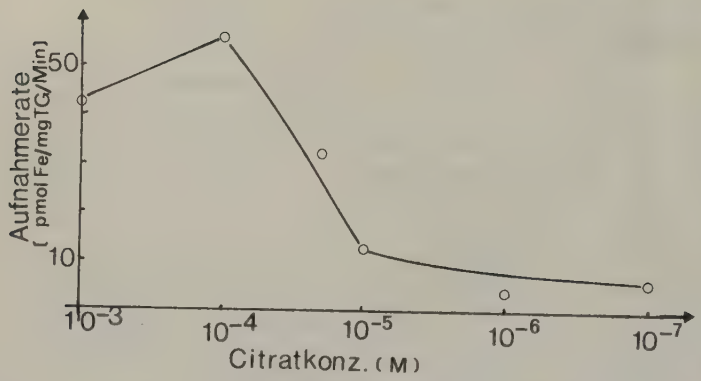


Abb. 14: Sukzessive Verdünnung von AB2847-Zellen in Medien mit abnehmender Citratkonzentration, wo sie für jeweils vier Generationen angezogen wurden. Getestet und gezeigt wurde die Aufnahmerate der vierten Generation. Der Transport wurde immer in Gegenwart von 1 mM Citrat, 0,1 mM NTA, 0,1% Glucose und 1 µM ^{55}Fe gemessen.

aufnahmeaktivitäten unter Standardbedingungen (1 mM Citrat/ 0,1 mM NTA und 1 µM ^{55}Fe) bestimmt. Die Aufnahmeaktivität blieb für 1 mM und bei 0,1 mM etwa erhalten (es wurde öfter beobachtet, daß die Eisenaufnahme eine leichte Erhöhung erfuhr, wenn die Zellen von einem 1 mM citrathaltigen in ein 0,1 mM haltiges Medium transferiert worden waren), nahm dann aber mit abnehmender Citratkonzentration ebenfalls ab. Die angeführte Erhöhung der Aufnahme kann aus einem sekundären regulatorischen Effekt auf "Substratebene" herrühren, der mit der unterschiedlichen Eisenversorgung in Gegenwart von 1 mM bzw. 0,1 mM Citrat zusammenhängt.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß das citratabhängige Eisentransportsystem eine hohe Spezifität bei der Induktion und bei der Aufnahme besitzt. Auf Grund der nicht toxischen Wirkung von Fluorocitrat und der sehr geringen Aufnahme von ^{14}C-Citrat erreichen vermutlich keine größeren Induktor-Konzentrationen das Cytoplasma. Für die Aufrechterhaltung des Systems ist Citrat in einer für eine Initialinduktion notwendigen Konzentration erforderlich. Dies deutet auf das Fehlen einer Autokatalyse hin, was mit einer Induktion von außen, ohne Akkumulation des Induktors über dasselbe Transportsystem übereinstimmt. Die intrazelluläre Citratkonzentration, obwohl ausreichend für eine Induktion von außen, induziert das System nicht. Das Wachstum in Gegenwart von Citrat führt offensichtlich nicht zur Vergrößerung des Citratpools in der Zelle. Diese Fakten unterstützen die Hypothese einer Induktion von außen.

3.2. Bedeutung der Eisenversorgung für die Regulation des Citrat-abhängigen Eisentransportsystems

Die Notwendigkeit des Chelators für die Induktion des Citratsystems unterscheidet es von den anderen Eisentransportsystemen bei *E. coli*. Während für eine Dereprimierung des Enterochelinsystems und für die Synthese des Enterochelins der bloße Eisenmangel ausreicht, ist die Anwesenheit von Citrat oder Fluorocitrat im Wachstumsmedium für eine Induktion des citratabhängigen Eisentransportsystems unerläßlich.

Die Frage, wem die Rolle des Induktors, dem Citrat allein oder dem Citrat-Eisen-Komplex, zuzuschreiben ist, steht im Vordergrund folgender Untersuchungen, die im allgemeinen den regulatorischen Einflüssen des Eisenmangels bzw. der Eisenversorgung auf die Induktion und Aufnahmeaktivität des Citratsystems gewidmet sind.

3.2.1. Einfluß der Eisenkonzentration im Vorwachstum auf die Aufnahmeaktivitäten der Ferrichrom- und Citratsysteme

Abb. 15 zeigt die Abhängigkeit der Citrat- und Ferrichromeisenaufnahmeraten von der Eisenkonzentration im Wachstumsmedium. Alle untersuchten Kulturen wurden in Anwesenheit von 0,1 mM Citrat in eisenextrahiertem M9-Medium mit Zusatz von den jeweils angegebenen $FeCl_3$-Konzentrationen angezogen. Die Eisenaufnahmeaktivität sowohl über das Citrat- als auch

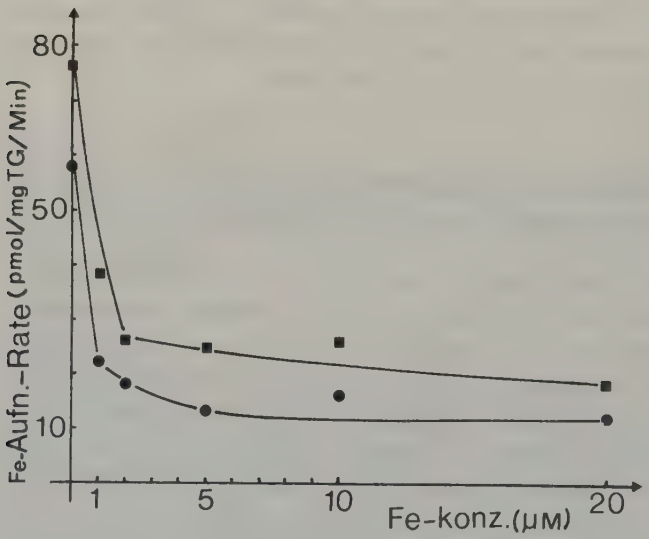


Abb. 15: Abhängigkeit der Citrat- und Ferrichromeisenaufnahme bei E. coli AB2847 von dem Eisengehalt des Mediums, in dem die Zellen vorgezüchtet wurden. (●) 1 mM Citrat, (■) 1 µM Ferrichrom.

über das Ferrichromsystem nahm schon bei den mit 1 µM Eisen gewachsenen Zellen im Vergleich zu den ohne zugesetztes Eisen gewachsenen drastisch ab. Die Eisenaufnahmerate über beide Systeme betrug bei der mit 1 µM Eisen versorgten Kultur nur noch ca. 40 bzw. 50% der Raten bei der ohne Eisenzusatz gewachsenen. Abb. 15 ist ferner zu entnehmen, daß das Wachstum in Anwesenheit von 5 µM Eisen die Aufnahmeaktivität beider Systeme auf etwa 20% ihrer maximalen Leistungen herabsetzte. Weitere Erhöhung des Eisengehaltes des Mediums bis zu 20 µM bewirkte keine wesentliche weitere Verringerung der Transportaktivität mehr. Zellen, die mit 1 mM Citrat und verschiedenen Eisenkonzentrationen bis zu 100 µM gewachsen waren, zeigten ein ähnliches Verhalten. 1 mM Citrat wurde zugesetzt, um ein Citrat-Eisen-Verhältnis zu haben, das die hohen Eisenkonzentrationen (50 und 100 µM) in Lösung hält.

Insbesondere die drastische Abnahme der Aufnahmeaktivität durch Zusatz von 1 µM Eisen zum extrahierten Wachstumsmedium läßt auf eine effektive Regulation schließen.

3.2.2. Einfluß von Ferrichrom auf die Induktion des Eisen-Citratsystems

3.2.2.1. Reprimierung der Eisenaufnahme bei E. coli AB2847 nach Wachstum im Ferrichrom-haltigen Medium

Um völlig ausschließen zu können, daß die verminderten Eisenaufnahmeraten bei den im eisenreichen Medium angezogenen Zellen (3.2.1) nicht eventuell durch unlösliches, an den Zellen adsorbiertes "kaltes" Eisen vorgetäuscht wurden, wurden Experimente angestellt, in denen das Wachstum in Gegenwart von 33 µM Ferrichrom (eisenreich) erfolgte. Als Induktor für das Citratsystem wurde dem Medium 1 mM Citrat zugesetzt. Erwartungsgemäß zeigten diese Zellen so gut wie keine citratabhängige, aber auch keine ferrichromabhängige Eisen-

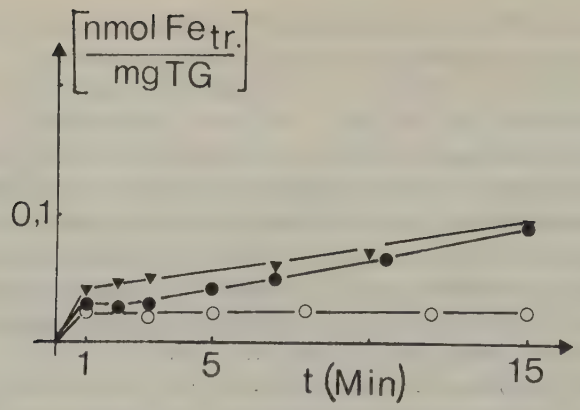


Abb. 16: Eisentransport nach Wachstum von AB2847 in Anwesenheit von 33 µM Ferrichrom und 1 mM Citrat. Eisenaufnahme mit (●) 1 mM Citrat, (▼) 1 µM Desferri-Ferrichrom und (○) 0,1 mM NTA.

aufnahme (Abb. 16). Hier wie in 3.2.1 stellt man zwar eine Reprimierung der Eisenaufnahme durch gute Eisenversorgung fest, jedoch geht daraus nicht hervor, ob es sich um eine primäre, auf Genebene, oder sekundäre, aus der Eisensättigung der Zellen resultierende Regulation handelt. Auf jeden Fall wird das durch Citrat induzierbare FecA-Protein bei Wachstum von AB2847 mit 10 µM Eisen und 1 mM Citrat synthetisiert (111).

3.2.2.2. Reprimierung des citratabhängigen Eisentransports auf Induktionsebene durch Desferri-Ferrichrom

Mit der Absicht, die Frage abzuklären, ob Citrat oder sein Eisenkomplex für die Induktion des Citratsystems verantwortlich zu machen ist, sollte das im extrahierten M9-Medium noch vorhandene Eisen mit überschüssigem Desferri-Ferrichrom komplexiert werden, so daß das Medium vor Zugabe von Citrat

kein nicht komplexiertes Eisen enthält. Da Ferrichrom einen sehr stabilen Eisenkomplex (log der Gleichgewichtskonstanten = 29,07) bildet, sollte kein Eisen-Citratkomplex gebildet werden.

3.2.2.2.1. AB2847

Die Zellen wurden in extrahiertem M9-Medium angezogen, das 30 - 60 Minuten vor Zugabe von 0,1 mM Citrat mit 0,05 oder 0,03 mM Desferri-Ferrichrom bei 37 °C inkubiert war. Abb. 17 zeigt, daß die citratabhängige Eisenaufnahme bei diesen Zellen herabgesetzt war. Dagegen war die Ferrichrom-Eisenaufnahme normal.

Da das Citrat-abhängige Eisentransportsystem trotz Anwesenheit von Citrat und trotz des Signals für die Expression der Eisenaufnahme nicht induziert wurde, kann angenommen werden, daß eisenfreies Citrat nicht induziert.

Um auszuschließen, daß die ausreichende Eisenversorgung über Ferrichrom die Expression des Eisen-Citrattransportsystems unterdrückt, wurden die Experimente mit einer Ferrichrom-transportmutanten (tonA) wiederholt.

3.2.2.2.2. P8 (tonA-Mutante)

Da tonA-Mutanten keine Ferrichromeisenaufnahme zeigen, müssen sie unter den Bedingungen von 3.2.2.2.1 unter sehr extremem Eisenmangel leiden. Zwei Bedingungen werden dadurch erfüllt, die für diese Untersuchung von Belang sind: Eisenfreies Citrat im Medium und intrazellulärer Eisenmangel. Abb. 18a zeigt, daß das Eisen-Citrattransportsystem normal induziert wurde, wenn die tonA-Mutante in Anwesenheit von

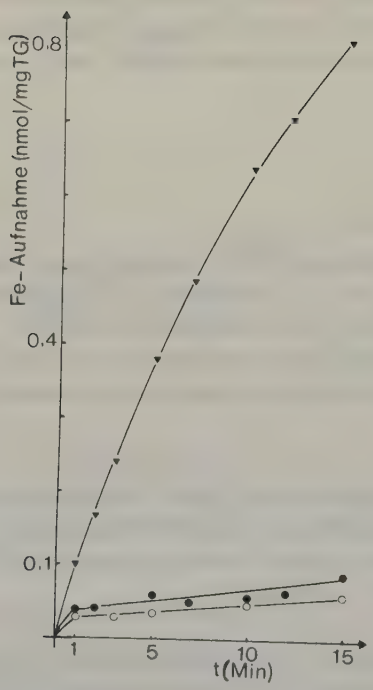


Abb.17: Eisentransport nach Wachstum in Anwesenheit von 50 µM Desferri-Ferrichrom und 0,1 mM Citrat. Aufnahme mit (●) 1 mM Citrat, (▼) 1 µM Desferri-Ferrichrom und (○) 0,1 mM NTA.

0,1 mM Citrat in extrahiertem Medium angezogen war. In der Abbildung ist auch gezeigt, daß Desferri-Ferrichrom die Eisen-Citrataufnahme bei induzierten Zellen unterdrückt, sicherlich durch Entzug des Eisens aus dem Eisen-Citrat-Komplex. Abb. 18a zeigt ferner den Eisen-Citrattransport bei Zellen, die in Gegenwart von 1 mM Citrat und 20 µM Desferri-Ferrichrom im extrahiertem Medium gewachsen waren. Er liegt auf dem Niveau nicht induzierter Zellen. Daraus kann man

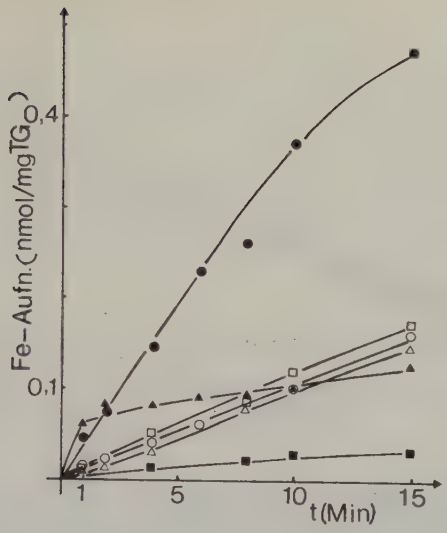


Abb. 18a: Citratabhängige Eisenaufnahme bei P8 nach Wachstum mit 1 mM Citrat (●), 0,6 mM Citrat und 20 µM Desferri-Ferrichrom (△), 0,1 mM NTA (○) und ohne Chelator (□). Ferrichromabhängige Eisenaufnahme (▲) und kompetitive Hemmung der Eisen-Citrataufnahme durch 10 µM Desferri-Ferrichrom in Abwesenheit von NTA (■) bei citratinduzierten P8-Zellen.

schließen, daß das Citratsystem nicht induziert wurde. Da das Ferrichrom eher für eine schlechte (Abb. 18a,b) Eisenversorung als für eine gute gesorgt haben muß, wird damit der Einwand gegen die Notwendigkeit des Eisen-Citratkomplexes für die Induktion des Citratsystems weitgehend entkräftet. Die entsprechenden NTA-Kontrollen in Abb. 18b zeigen, daß die Eisenaufnahme bei in Anwesenheit von Desferri-Ferrichrom und Citrat gewachsenen Zellen durch den Zusatz von Citrat nicht über das Grundniveau hinaus verbessert wurde. (Versehentlich ist in Abb. 18a eine Kurve dargestellt, die

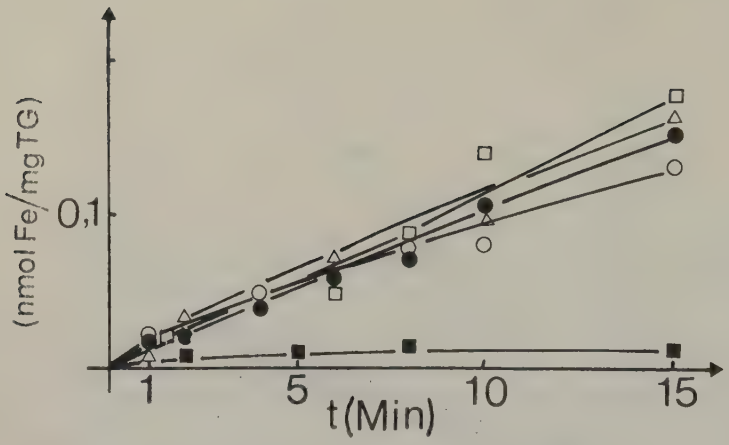


Abb. 18b: NTA-Eisenaufnahme bei den vier P8-Kulturen der Abb. 18a. Alle Symbole wie a), jedoch wurde dem Ansatz (■) neben 1 mM Citrat und 10 µM Desferri-Ferrichrom 0,1 mM NTA zugesetzt.

die Eisen-Citrataufnahme bei in Gegenwart von 0,1 mM NTA angezogenen tonA-Zellen präsentiert. Sie zeigt, daß NTA das Citratsystem nicht induziert hat.)

3.2.3. Einfluß von DHB bzw. Enterochelin auf die Induktion des Citratsystems bei den fep-Mutanten

Mit den nachstehend angestellten Experimenten war beabsichtigt, der Frage nach der Bedeutung des Eisens bzw. des Eisen-Citratkomplexes für die Induktion des Citratsystems mit Hilfe von DHB und dem eventuell daraus synthetisierten Enterochelin nach dem experimentellen Vorbild mit Desferri-Ferrichrom (3.2.2) nachzugehen. Im Prinzip sollten auch hier Bedingungen gewählt werden, unter denen eisenfreies Citrat im

Medium vorliegt. Dies ist möglich, wenn aus DHB Enterochelin synthetisiert werden kann, ohne daß es nach Komplexierung des Eisens aufgenommen wird. Fep-Mutanten sind in der Lage, Enterochelin aus DHB zu synthetisieren und ins Medium auszuscheiden. Eine Voraussetzung für den Erfolg dieser Experimente war, daß Enterochelin in genügender Menge synthetisiert wird, da DHB selbst auf Grund der geringeren Stabilität ihrer Eisenkomplexe (Stabilitätskonstante = $10^{4,18}$) (101) nur unzureichend die Bildung des Eisencitratkomplexes verhindert.

3.2.3.1. Induktion des citratabhängigen Eisentransports bei IR20 (fepA-Mutante) durch Citrat

Die fepA-Mutante, IR20, gewachsen unter Eisenmangelbedingungen in Gegenwart von 0,1 mM oder 1 mM Citrat, zeigte ein induziertes Eisen-Citrattransportsystem, unabhängig davon, ob DHB (20 - 100 µM) im Wachstumsmedium vorhanden war oder nicht (Abb. 19). Diese Mutante zeigte aber auch unter allen getesteten Wachstumsbedingungen eine unveränderte DHB-Eisenaufnahme. Dies läßt vermuten, daß die Eisenversorgung über beide Chelatoren simultan erfolgte, wenn sie gleichzeitig im Medium vorhanden waren, und daß die erhoffte Enterochelin-Synthese aus DHB und das daraus folgende Abfangen des Eisens entweder nicht oder nicht in den Maßen erfolgten, die für extremen Eisenmangel hätten sorgen können.

3.2.3.2. Bei AN260 (fepB-Mutante)

Die Induzierbarkeit des Eisen-Citratsystems bei der fepB-Mutente, AN260, war eher mit der tonA-Mutante zu vergleichen. Wie Abb. 20 zeigt, war die citratabhängige Eisenaufnahme stark reprimiert, wenn die Zellen in Anwesenheit von 0,1 mM DHB und 1 mM Citrat in extrahiertem M9-Medium gewachsen waren.

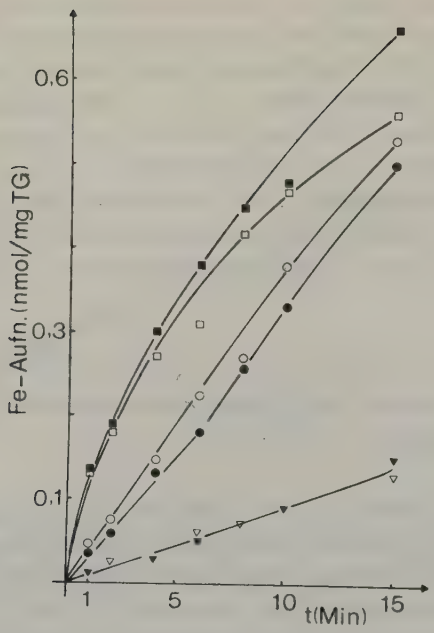


Abb. 19: Eisenaufnahme bei der fepA-Mutante (IR20) nach Wachstum in Gegenwart von 1 mM Citrat (offene Symbole) und von 1 mM Citrat und 0,1 mM DHB (geschlossene Symbole): (□ , ■) DHB-abhängige, (○ , ●) citratabhängige und (▽ , ▼) NTA-abhängige Eisenaufnahme.

Wenn die Zellen in Gegenwart von 1 mM Citrat ohne DHB oder mit Zusatz von 0,02 mM DHB gewachsen waren, war das Eisen-Citratsystem induziert, wobei die citratabhängige Aufnahme im zweiten Fall etwas schlechter war. DHB stimulierte bei diesem Stamm die Eisenaufnahme nicht über das Niveau der Aufnahme in Gegenwart von NTA hinaus. Diese Tatsache kann vielleicht erklären, warum die fepB- besser für die Untersuchung als die fepA-Mutante geeignet war. Eisenfreie DHB könnte von AN260 aufgenommen und für die Synthese von Enterochelin, das ausge-

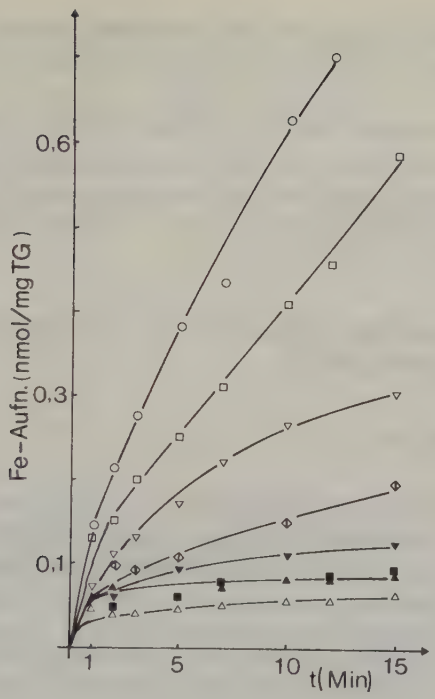


Abb. 20: Eisenaufnahme bei der fepB-Mutante (AN260) nach Wachstum in M9-Medium unter Variierung der Citrat- und DHB-Konzentration im Medium in folgender Weise: (○) 1 mM Citrat, (□, ■) 1 mM Citrat und 0,02 mM DHB, (▽, ▼) 1 mM Citrat und 0,1 mM DHB und (△, ▲) 0,1 mM Citrat und 0,1 mM DHB. Offene Symbole stehen für den citratabhängigen, geschlossene für den DHB-abhängigen und (Φ) für NTA-abhängigen Eisentransport.

schieden, jedoch nicht aufgenommen werden kann, verwendet werden. Enterochelin seinerseits könnte das Eisen des Mediums komplexieren und auf diese Weise für eisenfreies Citrat sorgen. Bei der fepA-Mutante (IR20) dagegen könnte die Eisenversorgung über DHB (0,1 mM) die Enterochelinsynthese unterdrükken.

3.2.4. Einfluß des Kupfers auf die Induktion und die Aufnahmeaktivität des Eisen-Citratsystems bei E. coli AB2847

Eine weitere Möglichkeit, den Zellen eisenfreies Citrat anzubieten, stellt das Angebot von Citrat zusammen mit einem Überschuß an einem mit Eisen um den Chelator konkurrierenden Metall dar. Diese Aufgabe sollte von Cu^{2+} erfüllt werden.

3.2.4.1. Hemmung des Wachstums durch Cu^{2+} und Aufhebung der Hemmung durch Citrat

3.2.4.1.1. Plattentest

Die Zugabe von 20 µl 0,1 mM $CuSO_4$-Lösung in ein Loch in einem mit AB2847-Zellen inkubierten M9-Agar erzeugt einen Hemmhof von 25 mm Durchmesser. Diese Hemmung konnte durch Zugabe von Citrat aufgehoben werden. 20 µl einer 0,1 mM Cu^{2+}- und einer 1 mM Citratlösung ergaben einen Wachstumshof von 12 mm Durchmesser.

Die durch 1 mM Cu^{2+} verursachte Hemmung konnte nicht durch äquimolare Konzentration von Citrat aufgehoben werden. Zur Kompensation der Kupferhemmung war ein ca. 5-facher molarer Überschuß an Citrat notwendig (Tabelle 5). Lutkenhaus konnte auf 20 µM Cu^{2+}-haltigem Medium kupferrestistente Mutanten von E. coli B/r und K12 selektionieren (72).

3.2.4.1.2. Hemmung des Wachstums und ihre Aufhebung in Flüssigkulturen

Wie Abb. 21 zeigt, hemmte 0,1 mM Cu^{2+} das Wachstum von E. coli AB2847 im flüssigen M9-Medium. Die Zugabe von 1 mM Citrat stimulierte das Wachstum in Gegenwart von 0,1 mM Cu^{2+}.

Tabelle 5: Hemmung des Wachstums von E. coli K12 AB2847 durch Kupfer. 20 µl der jeweiligen Lösungen wurden in ein Loch (6 mm ø) in M9-TTC-Agar gegeben, das mit AB2847-Zellen (ca. 10^8 Zellen/Platte) inokuliert war (siehe 2.7.3).

Konzentration (mM)		Durchmesser (mm)	
Cu^{2+}	Citrat	Hemmhof	Wachstumshof
0,02	0,0	(+)	(+)
0,1	0,0	25	
1,0	0,0	37	
0,02	0,1		+
0,1	1,0		12
1,0	1,0	13	
1,0	10,0		24

(+) = Weder Hemmung noch Stimulierung
\+ = Schwache Wachstumstimulierung

Während die Generationszeit der ersten Kultur ca. 130 Minuten betrug, hatte die zweite Kultur eine Verdoppelungszeit von ca. 56 Minuten, einen Wert, der mit denen in Abwesenheit von Kupfer identisch ist. Nach 9 Stunden war die erste Kultur bei einer OD von 0,31 quasi stationär und konnte sich in weiteren 14 Stunden gerade verdoppeln. Dagegen war die Citrat-haltige Kultur bis zur OD = 1,3 noch exponentiell. Das Wachstumsverhalten der Kultur ohne Kupfer und Citrat zeigt, daß die festgestellte Hemmung des Wachstums durch Cu^{2+} und nicht etwa durch Eisenmangel verursacht wurde. Die Aufhebung der Toxizität des Kupfers durch Citrat kann darauf beruhen, daß beide Substanzen einen Komplex bilden, der nicht aufgenommen wird. Sie bilden nämlich Di- und Monicitrat-Kupfer-Komplexe mit einer Gleichgewichtskonstante von $10^{13,22}$ bis 10^{18} (101).

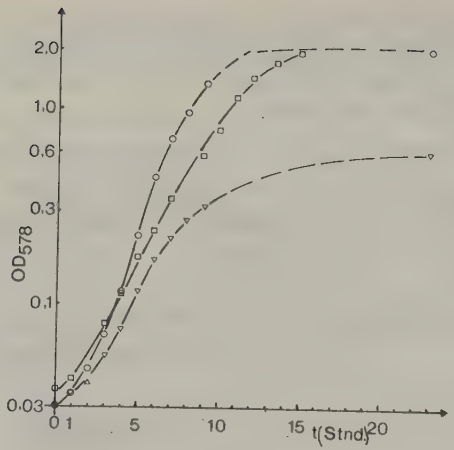


Abb. 21: Hemmung des Wachstums von E. coli AB2847 durch Cu^{2+} und die Aufhebung der Hemmung durch Citrat. (▽) Wachstum in Gegenwart von 0,1 mM $CuSO_4$, (○) Wachstum in Gegenwart von 0,1 mM $CuSO_4$ + 1 mM Citrat und (□) Wachstum ohne Zusätze.

3.2.4.2. Eisenaufnahme nach Wachstum in Anwesenheit von Cu^{2+} und Citrat

Die citratabhängige Eisenaufnahme wurde bei AB2847 nach Wachstum in Anwesenheit von 0,1 mM $CuSO_4$ und entweder 1 mM oder 0,1 mM Citrat oder 0,1 mM Citrat und 0,03 mM Desferri-Ferrichrom gemessen. Bei den ersten beiden Kulturen war das citratabhängige System normal induziert (Abb. 22 und 23). Dagegen konnte keine Citrat-abhängige Eisenaufnahme bei der dritten Kultur festgestellt werden. Diese Kultur zeigte jedoch normale Ferrichromeisenaufnahme, was auf eine spezifische Inhibierung der Induktion des citratabhängigen Systems durch Desferri-Ferrichrom, auch wenn Cu^{2+} vorhanden war, schließen läßt.

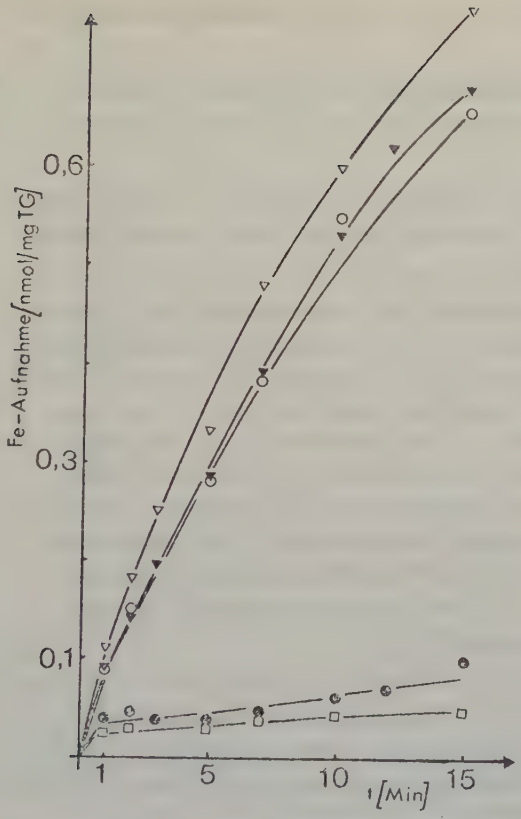


Abb. 22: Induktion des Eisencitratsystems in Gegenwart von Kupfer und Citrat. Offene Symbole: Zellen sind in Anwesenheit von 0,1 mM Citrat und 0,1 mM $CuSO_4$ gezüchtet. Geschlossene Symbole: Zellen in Anwesenheit von 0,1 mM Citrat, 0,1 mM $CuSO_4$ und 0,03 mM Desferri-Ferrichrom gezüchtet. (▽ , ▼) Eisenferrichromtransport, (○ , ●) Eisencitrattransport und (□) Eisen-NTA-Kontrolle.

Zur Erklärung der Induktion bieten sich drei potentielle Induktoren an:

1. Citrat, unabhängig davon, ob es allein oder im Metall-Komplex vorliegt. Damit können die beiden ersten Fälle erklärt werden.

2. Citrat-Metall-Komplex, unabhängig vom Metall. Damit können ebenfalls nur die ersten beiden Fälle erklärt werden.

3. Citrat-Fe^{3+}-Komplex und zwar als ausschließlicher Induktor. Damit könnte man alle drei untersuchte Fälle erklären, vorausgesetzt, daß Citrat unter den Versuchsbedingungen mit so hoher Affinität und Stabilität Eisenkomplex bildet, daß dieser entstehen kann, auch wenn Eisen und Kupfer im Verhältnis 1 : 100 im Medium vorhanden sind. Für die Erklärung der Inhibierung der Induktion durch Desferri-Ferrichrom reicht dann seine stabilere Komplexbildung mit Eisen (Stabilitätskonstante des Eisen-Ferrichroms = 10^{29} (94, 101) und des Eisen-Citrat-Komplexes = 10^{25} (101) oder $10^{18,83}$ vom Dicitrat-Eisenkomplex) (33), um es dem Citrat wegzunehmen.

Die Alternativen 1 und 2 sind daher auszuschließen, weil sie nicht erklären, warum das citratabhängige Transportsystem in Gegenwart von Desferri-Ferrichrom trotz Anwesenheit von 0,1 mM Citrat und genügend Kupfer im Medium nicht induziert wurde.

3.2.4.3. Kompetitionsversuche mit Cu^{2+}

Abb. 23a zeigt, daß der citratabhängige Eisentransport erst dann zum Erliegen kam, wenn Citrat : Cu^{2+} : NTA : Fe^{3+} im Verhältnis 1000 : 1000 : 100 : 1 µM im Transportansatz vorlagen. Ohne NTA war die Eisenaufnahme auf die Hälfte reduziert, im Vergleich zur Aufnahme in Abwesenheit von Cu^{2+}. Kleinere Kupferkonzentrationen bis zu 0,1 mM im Ansatz zeig-

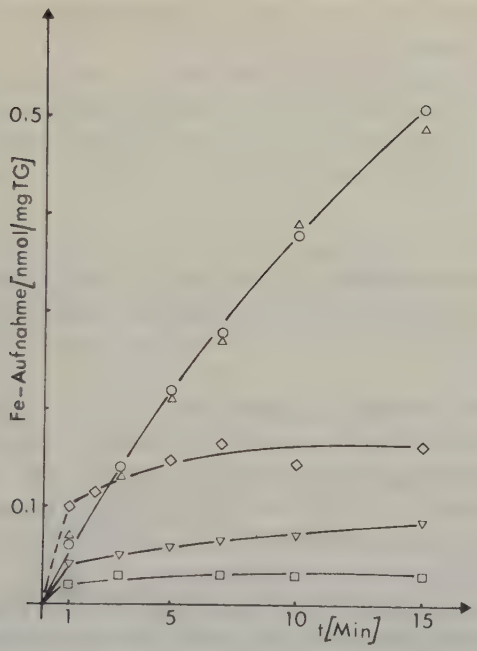


Abb. 23a: Kompetitionsversuche mit $CuSO_4$ bei AB2847-Zellen, die in M9-Medium in Anwesenheit von 1 mM Citrat und 0,1 mM $CuSO_4$ gewachsen waren. Eisencitrattransport (○), Eisencitrattransport mit Zusatz von 0,1 mM $CuSO_4$ (△) und von 1 mM $CuSO_4$ (▽). Eisen-NTA-aufnahme (□) und mit Zusatz von 0,1 mM $CuSO_4$ (◇).

ten keine oder eine vernachlässigbar geringe Hemmung der Eisen-Citrataufnahme (Abb. 23b. Da die Zellen in Anwesenheit von 0,1 mM Citrat und 0,1 mM $SuSO_4$ langsamer wuchsen, war die Eisenaufnahme niedriger (untere Kurve)).

Das Eisen war unter diesen Bedingungen in Lösung. Dies geht daraus hervor, daß die ^{55}Fe-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM

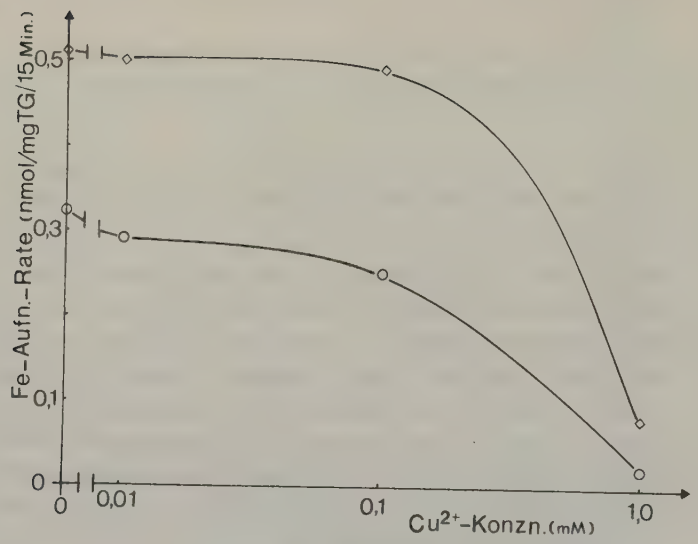


Abb. 23b: Einfluß von Kupfer auf den Eisencitrattransport bei AB2847-Zellen, die in Anwesenheit von 1 mM Citrat und 0,1 mM $CuSO_4$ (◇) und von 0,1 mM Citrat und 0,1 mM $CuSO_4$ (○) induziert waren. Die erste Kultur hat sich im Induktionsmedium viermal, die zweite nur zweimal in der gleichen Zeit verdoppelt (Anfangs-OD beider Kulturen = 0,03). Auf der Abszisse ist die Cu^{2+}-Konzentration im Eisen-Citrat-aufnahmemedium angegeben.

Cu^{2+} und 0,1 mM NTA nicht auf dem Filter (0,45 µ Porengröße) blieb, und daß die Zunahme der Aktivität bei den kleineren Kupferkonzentrationen ein kinetisches, auf Transport zurückzuführendes Verhalten hatte. Dagegen war es anders, wenn die Ansätze kein Citrat enthielten: Bei 1 mM Cu^{2+}, 0,1 mM NTA und 1 µM Fe^{3+} blieb die meiste ^{55}Fe-Aktivität auf den Filtern zurück (54, 66 und 72% der Gesamtaktivität nach einer, 3 und 15 Minuten). Eine Ausfällung der Radioaktivität wurde auch beobachtet, allerdings weniger drastisch, wenn Kupfer und NTA 0,1 mM im Medium waren.

Daß Cu^{2+} keine Kompetition mit der Eisen-Citrataufnahme zeigte, liefert den Beweis dafür, daß der Eisen- unter den Versuchsbedingungen mit höherer Affinität und Stabilität als der Kupfer-Citratkomplex gebildet wird (siehe 3.2.4.1.2). Dies ließe die Induktion der Citrat-abhängigen Eisenaufnahme trotz Anwesenheit von Kupferüberschuß auf die Bildung von Eisen-Citratkomplex zurückführen (siehe 3.2.4.2).

3.3. Untersuchungen zur Wirkung verschiedener C-Quellen auf das Eisen-Citrattransportsystem bei E. coli K12 AB2847

Bevor die unter 3.1.3 beschriebene icd-Mutante zur Verfügung stand, wurde durch Zucht der Zellen auf verschiedenen C-Quellen versucht, den intrazellulären Citratspiegel zu ändern, um zu prüfen, ob so durch intrazellulär angehäuftes oder nach Ausscheiden von Citrat in das Medium die Induktion des Eisen-Citrattransports bewerkstelligt werden kann. Ferner sollte geprüft werden, ob zugesetztes Citrat bei einer der C-Quellen als Cosubstrat dienen kann. Bei Aufnahme von Citrat in die Zelle wäre der Einfluß dieses Transports auf die Induktion des Eisen-Citrattransportsystems interessant.

3.3.1. Acetat

Auf 0,4% Acetat als einzige C-Quelle gewachsene AB2847-Zellen zeigten nur dann citratabhängigen Eisentransport, wenn Citrat (1 mM) im Wachstumsmedium vorhanden war. Dies und die Evidenzien im 3.1.3, Abb. 11 mit der icd-Mutante von AB259 schließen eine Induktion des citratabhängigen Eisentransports durch eventuell angehäuftes Citrat in den Zellen aus. Lowry et al. fanden bei auf Acetat gewachsenen E. coli-Zellen eine Anhäufung von 1,9 mM Citrat im Medium (68). Dies scheint zumindest für den Stamm AB2847 nicht zuzutreffen.

Die DHB-Eisenaufnahme war bei Acetat-gewachsenen Zellen normal und unabhängig von der Energiequelle (0,1% Glucose oder Acetat) im Aufnahmetest.

3.3.2. Glyzerin

Das Eisen-Citratsystem zeigte eine normale Induktion nach Wachstum von AB2847 auf Glyzerin (34 mM) als C-Quelle in Gegenwart von 1 mM Citrat. Der Transport war gleich gut energetisierbar mit 0,1% Glucose oder Glyzerin. Glyzerin konnte jedoch den Transport nicht energetisieren bei Zellen, die auf Glucose gewachsen waren (Abb. 24). Dies kann damit zusammenhängen, daß Glyzerinaufnahme und Metabolismus zuerst induziert werden müßten, bevor es als C- und Energiequelle genützt werden kann. Die ^{14}C-Citrataufnahme erfuhr keine Verbesserung durch Anzucht der Zellen auf Glyzerin (Tabelle 2), was gegen eine Katabolitrepression des Eisen-Citrattransportsystems spricht.

3.3.3. Lactat

Ursprünglich sollte untersucht werden, ob Lactat und Pyruvat (3.3.4) als Cosubstrate für die Verwertung von Citrat dienen. Wachstumsexperimente im Biophotometer mit konstanten Mengen an Lactat und Pyruvat und variierenden Citratkonzentrationen (0 - 20 mM) zeigten jedoch, daß dies nicht der Fall war. Es wurde lediglich ein Unterschied im Wachstum zwischen Kulturen, die Citrat (1 mM und darüber),und denen, die überhaupt kein Citrat erhielten, festgestellt. Da DHB das Citrat ersetzen konnte und keine Stimulierung durch weitere Erhöhung der Citratkonzentration erzielt wurde, war es klar, daß die Stimulierung aus der Rolle des Citrats als Eisenchelator herrührte.

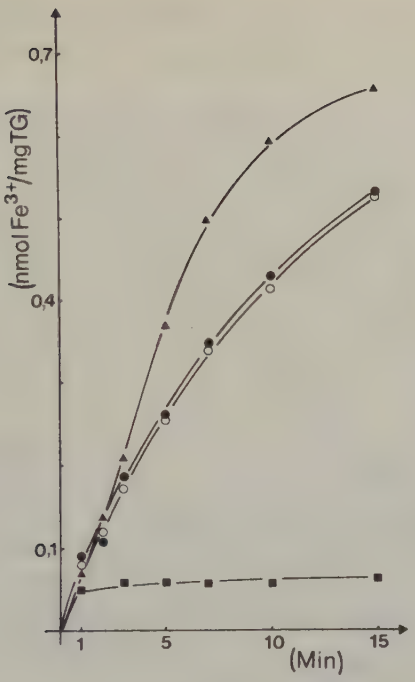


Abb. 24: Eisentransport bei AB2847-Zellen nach Wachstum auf 34 mM Glyzerin als C-Quelle in Gegenwart von 1 mM Citrat in eisenextrahiertem M9-Medium. Citratabhängige Eisenaufnahme mit 10 mM Glyzerin (●) und mit 0,1% Glucose (○) als C-Quellen. DHB-abhängige (▲) und NTA-abhängige (■) Eisenaufnahme mit 10 mM Glyzerin als C-Quelle.

Zum Beispiel erreichte E. coli AB2847 nach 25 Stunden Wachstum in Gegenwart von 10 mM Citrat und jeweils 5, 6, 20 und 27,8 mM Lactat die optischen Dichten 0,43, 1,69 und 2,1. Dagegen wurden die optischen Dichten 0,41, 0,43 und 0,39 bei den Citratkonzentrationen 15, 10 und 2 mM erreicht, wenn eine konstante Lactatkonzentration von 5,6 mM im Medium war.

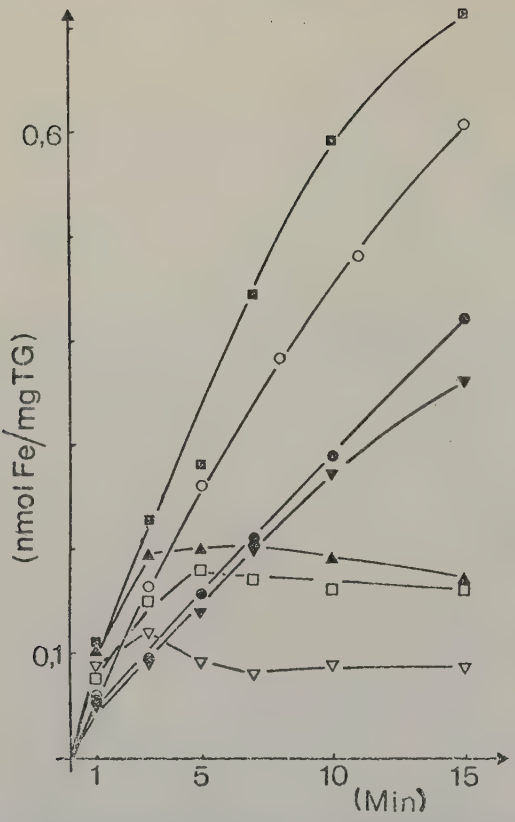


Abb. 25: Wirkung der C-Quellen, Lactat und Pyruvat auf den Eisentransport bei E. coli AB2847. Die Zellen wurden immer in eisenextrahiertem M9-Medium gezüchtet. Eisenaufnahme in Abhängigkeit von Citrat mit 0,1% Lactat (●), mit 0,4% Lactat (▲), mit 0,1% Glucose (▼) als Energiequellen und in Abhängigkeit von Ferrichrom mit 0,1% (■) und mit 0,4% Lactat (□) als Energiequellen bei Zellen, die in Gegenwart von 0,4% Lactat und 1 mM Citrat gezüchtet waren. Citratabhängige Eisenaufnahme mit 0,1% Pyruvat bei Zellen, die in Gegenwart von 0,4% Pyruvat und 1 mM Citrat gewachsen waren (○) und mit 0,1% Lactat bei auf 0,4% Glucose und 1 mM Citrat angezogenen Zellen (▽).

Wie bereits in 3.1.2.3 (Tabelle 2) erwähnt wurde, fehlte die Citrataufnahme auch in Gegenwart von Lactat und Pyruvat.

Das citratabhängige Eisentransportsystem wurde jedoch induziert, wenn die Zellen auf Lactat als C-Quelle in Anwesenheit von 1 mM Citrat angezogen waren. Solche Zellen konnten den Eisen-Citrat- sowie den Eisen-Ferrichromtransport mit 0,1% Glucose oder Lactat energetisieren. 0,4% Lactat hemmte beide Transportsysteme (Abb. 25). Lactat konnte nicht als Energiequelle für den Eisentransport durch auf Glucose gewachsene Zellen genützt werden.

3.3.4. Pyruvat

Das citratabhängige Eisentransportsystem konnte durch Citrat induziert werden, wenn die Zellen (AB2847) auf Pyruvat als C-Quelle wuchsen (Abb. 25). Dagegen wurde keine signifikante Citrataufnahme gemessen, die auf eine Citratverwertung schließen ließe (Tabelle 2).

Die Experimente mit verschiedenen C-Quellen lassen den Schluß zu, daß die Induktion des Eisen-Citrattransportsystems der Katabolitrepression durch Glucose nicht unterliegt. Die Induktion ist ferner von einer Citrataufnahme wahrscheinlich unabhängig, denn die Induktion der Citrataufnahme bei anderen Organismen wird durch Glucose unterdrückt. Es konnten schließlich keine Hinweise darauf gefunden werden, daß Citrat unter aeroben Bedingungen mit anderen Cosubstraten als C-Quelle verwertet wird.

3.4. pH-Einfluß auf die Eisen-Citrataufnahme

Die citratabhängige Eisenaufnahme zeigt ein Optimum in einem pH-Bereich zwischen 5 und 7. Die höchste Aufnahmeaktivität

in Gegenwart von Citrat und NTA wurde bei pH 6 gemessen.

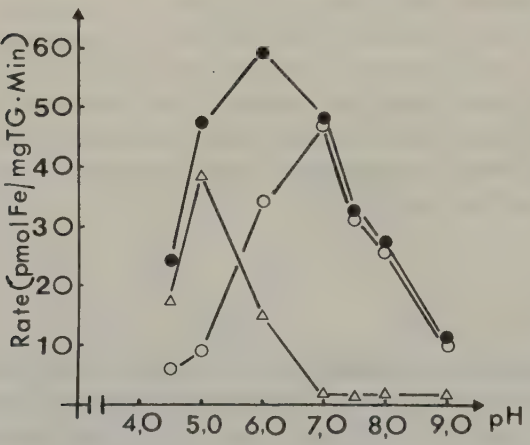


Abb. 26: Eisen-Citrataufnahme (●) und Eisen-NTA-Aufnahme (△) in Abhängigkeit vom pH und die rechnerisch ermittelte Differenz (○) zwischen beiden Kurven.

Wie Abb. 26 zeigt, wurde im sauren pH-Bereich eine hohe Eisenaufnahmeaktivität in Anwesenheit von NTA (Optimum bei pH 5) beobachtet. Der Abzug dieser Aufnahme von der citratabhängigen Aufnahme in Gegenwart von NTA führt zu einer Verschiebung der Optimumskurve mit einer gewissen Symmetrie um pH 7. Bei pH 7, wo die Eisenaufnahme normalerweise in dieser Arbeit gemessen wurde, hat NTA kaum einen Einfluß auf die Eisen-Citrataufnahme.

In seinem pH-Optimum stimmt das citratabhängige Eisentransportsystem mit anderen aktiven Transportsystemen überein.

3.5. Wirkung von künstlichen Veränderungen an der Zellperipherie auf den Eisentransport

Die Beteiligung von Rezeptoren der äußeren Membran an der Überwindung der Barriereeigenschaften der Zellhülle ist für mehrere aktive Transportprozesse nachgewiesen. Als Beispiele seien die am Eisentransport teilhabenden Proteine FepA, TonA und FecA, die Rezeptoren für Enterochelin bzw. Ferrichrom bzw. Eisencitrat genannt. Außerdem müssen alle transportierten Substrate durch das Periplasma an die Cytoplasmamembran und schließlich in das Zellinnere eingeschleust werden.

Durch besondere Behandlungen der Zellen soll die Beteiligung der Zellhülle, einschließlich des Periplasmas, am Eisentransport demonstriert werden.

Behandlung der Zellen mit Pronase soll Aufschluß über die Angreifbarkeit der Eisenrezeptoren durch die Protease, über ihre Exponiertheit nach außen und über die Auswirkungen auf die Eisenaufnahme geben.

Durch Behandlung der Zellen mit spezifischen Reagenzien, z.B. NEM, sollten Informationen über die aktiven Gruppen der Rezeptoren gewonnen werden.

Schließlich sollte durch den osmotischen Schock ermittelt werden, ob lösliche Proteine des periplasmatischen Raumes am Eisentransport beteiligt sind.

3.5.1. Behandlung ganzer Zellen mit Pronase

3.5.1.1. Lebensfähigkeit nach der Behandlung

Mit Pronase behandelte Zellen von *E. coli* AB2847 und P8 wurden unter dem Mikroskop beobachtet und mit unbehandelten

Zellen der jeweiligen Kultur verglichen. Dabei ergab sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. In beiden Fällen waren taumelnde kurze Stäbchen zu erkennen. Die Taumelbewegung und die morphologische Gleichheit sind als qualitative Beweise der Lebensfähigkeit zu betrachten. Pronasebehandelte sedimentierte Zellen waren jedoch schwieriger zu resuspendieren.

Um die Lebensfähigkeit quantitativ zu ermitteln, wurde die Lebendkeimzahl von behandelten und unbehandelten AB2847-Zellen aus der gleichen Kultur bestimmt. Die Überlebensrate der behandelten Zellen wurde mit 87% und die der unbehandelten mit 93% gefunden.

3.5.1.2. Wirkung der Pronase auf den Eisentransport

3.5.1.2.1. AB2847

Die citratabhängige Eisenaufnahme unterschied sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Ferrichrom- und DHB-Eisenaufnahme. Wenn durch 1 mM Citrat induzierte AB2847-Zellen mit 5 mg/ml Pronase 30 Min. bei 37 °C im Eisenaufnahmepuffer inkubiert wurden, so war die citratabhängige Eisenaufnahme auf das Niveau nicht induzierter Zellen herabgesetzt. Abb. 27a zeigt, daß die Eisen-Citrataufnahme behandelter Zellen ca. 22% der Aufnahme ohne Behandlung mit Pronase ausmachte. Dagegen betrug die Ferrichrom-Eisenaufnahme nach der Behandlung ca. 71% der Aufnahme ohne Pronasebehandlung. Dies war unabhängig davon, ob der Aufnahmetest in Gegenwart von 0,25 mg Pronase/ml (Verdünnen der Suspension 1 : 20, siehe 2.14) oder nach Entfernen der Pronase durch Waschen durchgeführt wurde. Mit DHB wurde sogar eine gesteigerte Eisenaufnahme (126%) nach der Pronasebehandlung gemessen (Abb. 27b). In diesem Fall wurde eine erhöhte Aufnahme (oder Adsorption) in der ersten Minute beobachtet, die durch Entfernen der Pronase

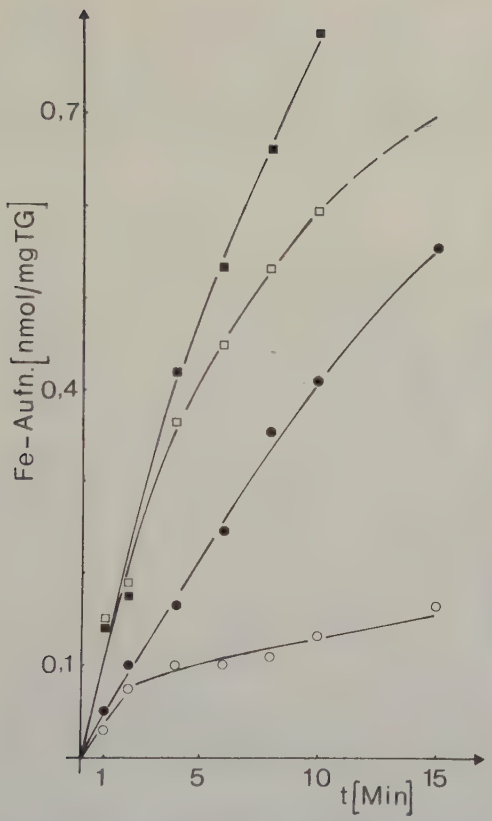


Abb. 27a: Eisentransport bei AB2847-Zellen nach Behandlung mit Pronase nach 2.14 (offene Symbole) im Vergleich zum Transport bei unbehandelten Zellen (geschlossene Symbole): Ferrichromtransport (□ , ■) und Eisen-Citrattransport (○ , ●).

vor dem Test auf niedrigen (normalen) Wert gebracht werden konnte. Unter diesen Bedingungen machte die DHB-Eisenaufnahme immer noch über 82% der Aufnahme vor der Behandlung mit Pronase aus.

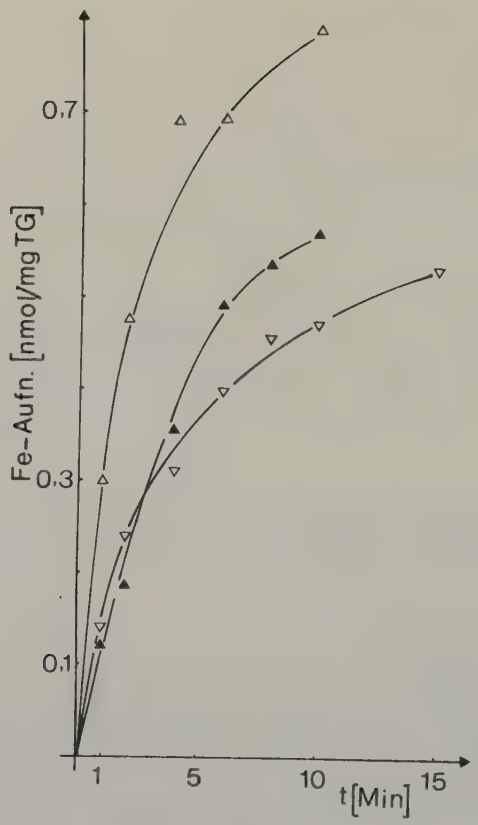


Abb. 27b: Eisentransport bei AB2847-Zellen nach Behandlung mit Pronase nach 2.14 (offene Symbole) im Vergleich zum Transport bei unbehandelten Zellen (geschlossene Symbole): DHB-Eisentransport (△, ▲) und DHB-Eisentransport bei behandelten Zellen nach Entfernen von Pronase durch Waschen (▽).

3.5.1.2.2. P8 (tonA-Mutante)

Die Resistenz des Ferrichromsystems gegen die Verdauung mit Pronase gab den Anlaß dazu, die Wirkung von Pronase auf die

Ferrichrom-Eisenaufnahme bei einer Mutante, der der Rezeptor fehlte, zu testen, um feststellen zu können, ob die Rezeptorfunktion an der Aufnahme bei behandelten Zellen beteiligt war. Überraschenderweise zeigte die tonA-Mutante eine erhöhte Ferrichrom-Eisenaufnahme nach Behandlung mit Pronase (Abb. 28).

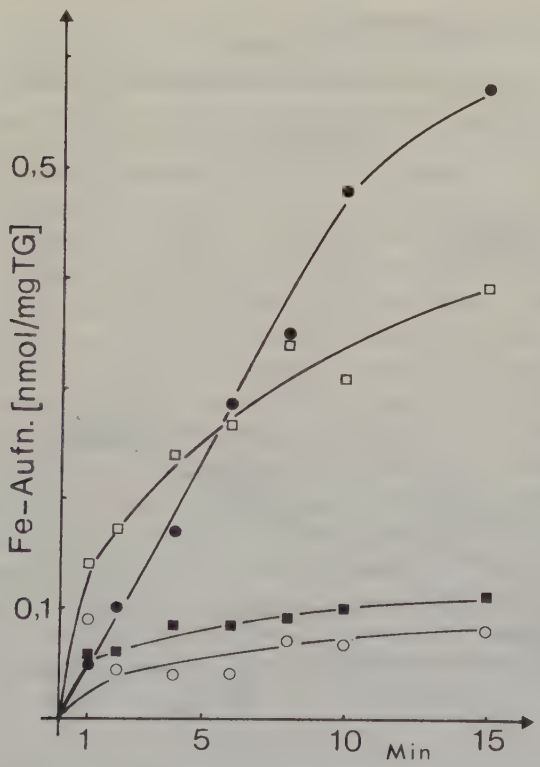


Abb. 28: Eisentransport bei einer tonA-Mutante (P8) vor und nach Behandlung mit Pronase. Ferrichrom-Eisentransport mit behandelten (□) und mit unbehandelten (■) und Eisen-Citrattransport mit behandelten (○) und mit unbehandelten (●) Zellen.

Die Aufnahme wurde nach der Behandlung nämlich verdreifacht und betrug damit ca. 50% der Transportaktivität der unbehandelten AB2847-Zellen. Demnach scheint das Ferrichrom-Eisen an TonA vorbei in die Zelle eingeschleust worden zu sein. Die Eisen-Citrataufnahme erfuhr die gleiche Reduzierung durch Pronase wie bei AB2847.

3.5.1.2.3. BR158 (tonB-Mutante)

Behandlung der tonB-Mutante mit Pronase führte, wie Abb. 29 zeigt, zur Eliminierung einer Restaktivität des Eisen-Citrat-

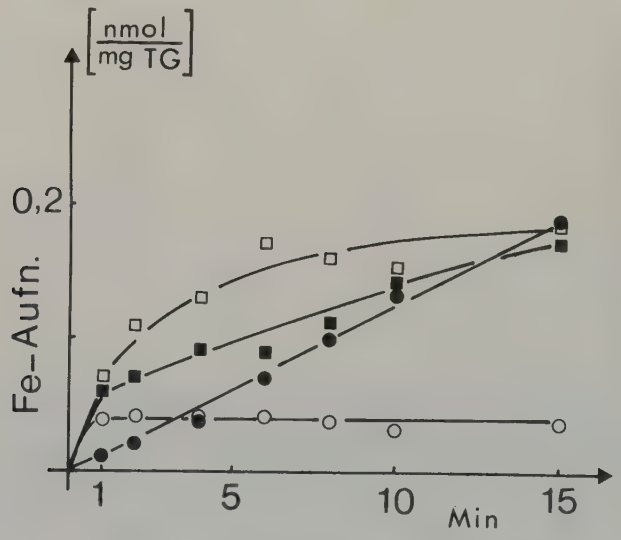


Abb. 29: Eisentransport bei einer tonB-Mutante (BR158) vor und nach Behandlung mit Pronase. Ferrichrom-Eisentransport mit behandelten (□) und mit unbehandelten (■) und Eisen-Citrattransport mit behandelten (○) und mit unbehandelten (●) Zellen.

systems, die bei unbehandelten Zellen noch zu finden war. Das Ferrichromsystem blieb durch die Behandlung unverändert: Es wurde weder eine Stimulierung noch eine Hemmung durch Pronaseverdauung festgestellt. Dieser Befund deutet an, daß die Ferrichrom-Eisenaufnahme bei pronasebehandelten Zellen das TonA-Protein (Rezeptor) zwar umgehen kann, aber nach wie vor ein funktionierendes tonB-Genprodukt benötigt.

3.5.1.3. Verändertes Proteinmuster der Außenmembran von E. coli K12 nach Behandlung mit Pronase

Inkubation von E. coli K12 AB2847 für 30 Min. bei 37 °C mit Pronase in Eisenaufnahmepuffer führte zu einer gravierenden Veränderung des Proteinmusters der Außenmembran. Auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel fehlten die meisten Proteine oberhalb der Hauptproteine, darunter 83K, FepA, FecA, TonA, 76K und Cir, sowie das Hauptprotein OmpA (II^*, Abb. 30). Diese gravierende Hydrolyse war zu beobachten, obwohl die Zellen vor dem Aufschluß in der French-Presse gründlich (6 mal mit Saline oder Hepes-Puffer) gewaschen wurden, um die Pronase zu entfernen und einen eventuellen Angriff an isolierten Membranen zu verhindern. Eine Inaktivierung der Pronase mit Proteasehemmern wurde allerdings nicht versucht. Führte man jedoch die gleiche Behandlung im Hepes-Puffer durch, so war die Verdauung durch Pronase keineswegs so drastisch. FecA, TonA, OmpA u. a. Proteine blieben unversehrt (111). Die Wirkung solcher Behandlung (im Hepes-Puffer) auf die Eisen-Citrat- und Ferrichromaufnahme war aber mit der in EAM identisch.

3.5.2. N-Äthylmaleinimidhemmung des Eisentransports

Zugabe von 120 µM N-Äthylmaleinimid (NEM) zum Transportansatz führte zur Hemmung der Ferrichrom-, Citrat- und DHB-

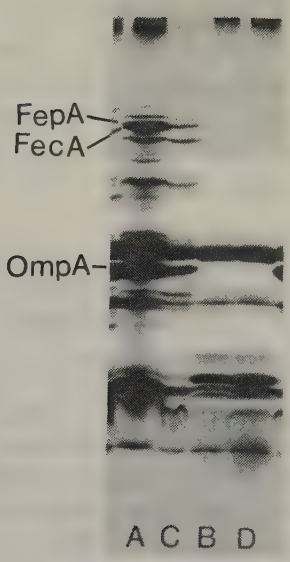


Abb. 30: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der äußeren Membranproteine von E. coli AB2847, die in M9-Medium unter Eisenmangel in Gegenwart von 1 mM Citrat (A) und (B) oder in Gegenwart von 20 µM DHB (C) und (D) angezogen waren. (B) und (D): Die ganzen Zellen wurden mit 5 mg Pronase/ml bei 37 °C für 30 Min. nach 2.14 behandelt. Bevor die behandelten Zellen aufgebrochen wurden, wurden sie 6 mal mit HEPES-Puffer gewaschen, um die Pronase zu entfernen.

Eisenaufnahme um jeweils 31,6 bzw. 55 und 87,6% (Abb. 31. Verglichen wurden jeweils die 10-Minutenwerte in An- und Abwesenheit des Inhibitors). Die unterschiedliche Wirkung des Inhibitors auf die drei Transportsysteme weist darauf hin, daß NEM durch eine spezifische Reaktion mit dem jeweiligen System die Inhibierung herbeigeführt hat. Da NEM ein Inhibitor der Sulfhydrylgruppen ist und von E. coli wahrscheinlich nicht aufgenommen wird, muß man fordern, daß die Rezeptoren

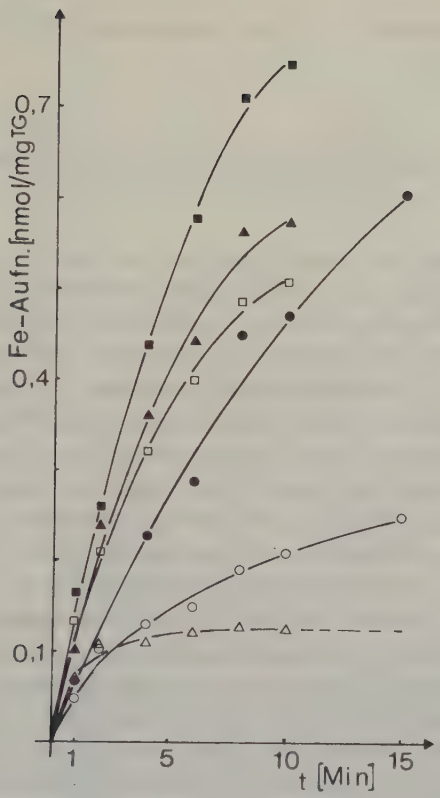


Abb. 31: Einfluß von NEM auf den Eisentransport bei E. coli AB2847. Eisentransport bei unbehandelten (geschlossene Symbole) und bei mit NEM behandelten (offene Symbole) Zellen. Die Zugabe von 120 µM NEM erfolgte 30 Sek. vor dem Start des Transports. (□), (■) Ferrichromtransport. (○), (●) Eisen-Citrattransport. (△), (▲) Eisen-DHB-Tansport.

von Citrat- und vor allem von DHB-Eisen für ihre Reaktion mit dem entsprechenden Eisenkomplex aktive Sulfhydrylgruppen benötigen. Die Überlebensfähigkeit der Zellen nach solcher

Behandlung wurde zwar nicht bestimmt, die NEM-bedingte Hemmung ist jedoch umkehrbar (93), was gegen eine Abtötung der Zellen durch den Inhibitor spricht.

3.5.3. Einfluß des osmotischen Schocks auf den Eisentransport

Das citratabhängige Eisentransportsystem hat sich als das empfindlichste von allen drei untersuchten Eisentransportsystemen für den milden osmotischen Schock nach Heppel (52) erwiesen. Während das Eisen-Citratsystem mehr als 70% seiner Aktivität durch die Schockbehandlung einbüßte und damit mit dem schockempfindlichen Glutamintransportsystem vergleichbar war, wurden 40 - 50% und über 70% der Aktivitäten der DHB- bzw. Ferrichromsysteme nach dem Schock erhalten (Abb. 32a). Die Schockbedingungen (siehe 2.16) wurden so gewählt, daß über 80% der Prolinaufnahme zu beobachten war. Unter diesen Bedingungen war die Glutaminaufnahme auf weniger als 30% reduziert (Abb. 32b). Daraus kann man den Schluß ziehen, daß das Eisen-Citratsystem bestimmte Komponenten aus dem periplasmatischen Raum durch die Schockprozedur verloren hat, was auch durch Bindungsaktivität der konzentrierten Schockflüssigkeit mit dem ^{55}Fe-Citrat nachgewiesen wurde (nicht gezeigt). Dagegen war das Ferricrhomsystem mit dem Prolinaufnahmesystem, wofür keine lösliche Bindeproteine nachgewiesen werden konnten (51), vergleichbar.

Weitere Versuche zur Charakterisierung der Schockflüssigkeit sowie zur Rekonstituierung des Eisen-Citratsystems (mit der Schockflüssigkeit) und zur Ermittlung, ob eine erneute Induktion für die Entfaltung der vollen Aktivität des Systems notwendig ist, sind vorgesehen.

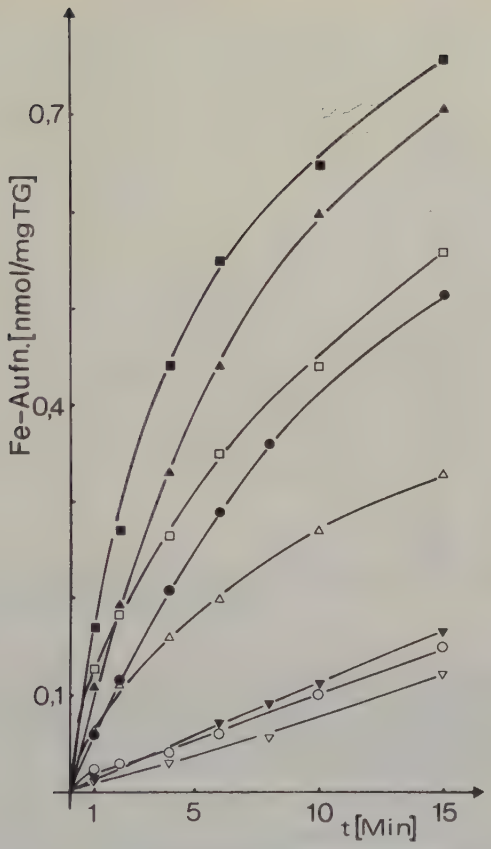


Abb. 32a: Einfluß des osmotischen Schocks auf den Eisentransport. Eisentransport bei ganzen (geschlossene Symbole) und bei mit osmotischem Schock behandelten (offene Symbole) AB2847-Zellen. (■), (□) Ferrichrom-, (●), (○) Citrat-, (▲), (△) DHB- und (▼), (▽) NTA-abhängiger Eisentransport.

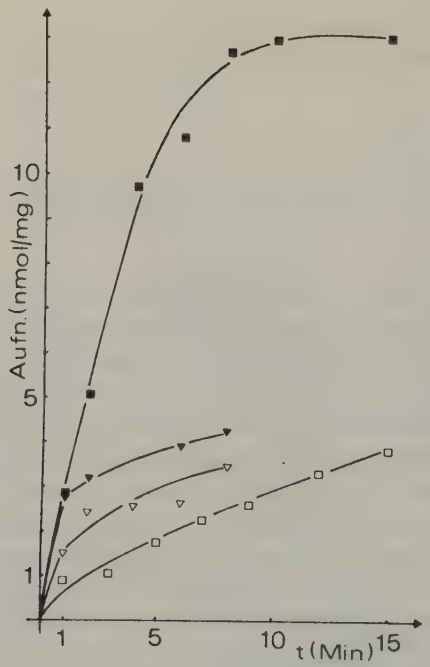


Abb. 32b: Einfluß des osmotischen Schocks auf den Prolin- und Glutamintransport bei E. coli AB2847. ^{3}H-Prolinaufnahme bei ganzen (▼) und bei geschockten (▽) Zellen. ^{14}C-Glutaminaufnahme bei ganzen (■) und bei geschockten (□) Zellen.

3.6. Anaerobes Wachstum und Eisentransport

Escherichia coli ist, wie mehrere andere Enterobakterien, ein fakultativ anaerober Mikroorganismus. Eisen ist auch unter anaeroben Bedingungen ein wichtiges Metall für das Wachstum von E. coli. Es kommt mit vielen, zum Teil nur für den anaeroben Stoffwechsel synthetisierten, Enzymen wie z.B. die Formiatdehydrogenase, Nitratreduktase, Cytochrom $b_{556}^{NO_3^-}$ (nur anaerob) und b, Schwefel-Eisen-Proteine und anderen als Co-

faktor assoziiert vor (38, 73).

Bislang wurde jedoch fast nichts über die Eisenaufnahme unter anaeroben Bedingungen publiziert. Rosenberg und Young erwähnten, daß Enterochelin unter anaeroben Bedingungen von E. coli K12 nicht synthetisiert wird (97). Diese Studie befaßt sich mit dem Eisentransport bei anaerob angezogenen Zellen, wobei das Hauptinteresse an der Induzierbarkeit des citratabhängigen Eisentransportsystems unter anaeroben Bedingungen und an den Auswirkungen des "Shiftens" aerob induzierter Zellen zum anaeroben Wachstum auf die Induktion liegt. Die Bedeutung dieser Arbeit ist für das Verständnis der Induktion um so größer, weil unter anaeroben Bedingungen E. coli in der Lage ist, Citrat mit dem Cosubstrat Glucose über den sogenannten fermentativen Weg als C-Quelle zu verwerten, was ja dessen Aufnahme voraussetzt.

3.6.1. Einfluß einiger Eisenchelatoren auf das anaerobe Wachstum von E. coli AB2847

Unter aeroben Bedingungen wird das Wachstum von aroB-Zellen (wie AB2847) durch Citrat und DHB stimuliert. Gerade die Stimulierung des Wachstums von in der Enterochelinsynthese defekten Mutanten durch Citrat führte Young et al. erstmalig zur Vermutung einer citratabhängigen Eisenaufnahme (122). Analog dazu wurde die Wirkung von Citrat, DHB und Bipyridyl auf das Wachstum von E. coli AB2847 unter anaeroben Eisenmangelbedingungen getestet. Bipyridyl wurde aus zwei Gründen eingesetzt: 1. Weil es unter aeroben Bedingungen das Wachstum von E. coli AB2847 durch Komplexierung des Eisens in einer nicht transportierbaren Form hemmt, und 2. weil es Fe^{2+} komplexieren soll, das möglicherweise unter anaeroben Bedingungen dominierend ist.

Tabelle 6: Einfluß von Citrat, DHB und Dipyridyl auf das Wachstum von E. coli AB2847 unter anaeroben Bedingungen. Das Wachstum erfolgte in eisenextrahiertem M9-Medium mit 0,4% Glucose und allen anderen für das Wachstum des aroB-Stammes erforderlichen Zusätzen in 5 ml-Ansätzen im Anaerobier-Topf. Die optische Dichte zum Zeitpunkt Null war 0,028.

Substrat	Konzentration (mM)	Wachstum nach 42 Std. (OD_{578})
--	--	0,373
Citrat	0,1	0,338
	1,0	0,342
	5,0	0,53
	10,0	0,541
	30,0	0,7+
DHB	0,01	0,41
	0,02	0,276
	0,05	0,421
	0,1	0,303
Dipyridyl	0,01	0,317
	0,02	0,269
	0,05	0,084
	0,1	0,053
Citrat : Dipyridyl	0,05 : 0,1	0,054
	0,1 : 0,1	0,054
	1,0 : 0,1	0,096
	5,0 : 0,1	0,119
Citrat : DHB	0,1 : 0,02	0,332
	5,0 : 0,02	0,475
DHB : Dipyridyl	0,02 : 0,02	0,278
	0,02 : 0,05	0,203
	0,05 : 0,02	0,361
	0,1 : 0,1	0,159

+ = 10 mM Glucose (0,2%), 16 Std.

Tabelle 6 zeigt, daß eine Erhöhung der Konzentration von Bipyridyl im Medium eine Hemmung des Wachstums ergab. Bei 0,1 mM Bipyridyl war nach 42 Stunden Inkubation kaum Wachstum feststellbar.

Obwohl bei 5 mM Citrat eine deutliche Stimulierung des Wachstums beobachtet wurde, konnte Citrat bei dieser Konzentration die durch 0,1 mM Bipyridyl verursachte Hemmung nur geringfügig aufheben (von OD = 0,053 auf 0,12, siehe Tabelle). Dies könnte zunächst darauf zurückgeführt werden, daß Bipyridyl stabilere Komplexe mit dem wahrscheinlich als Fe^{2+} vorliegenden Eisen bildete und so die Versorgung der Zellen über Citrat unmöglich machte.

Die Erhöhung der Citratkonzentration im Wachstumsmedium führte zwar zur Verbesserung des Wachstums, eine Konzentration (1 mM) jedoch, mit der optimale Stimulierung des aeroben Wachstums erzielt werden kann, vermochte keinerlei Stimulierung gegenüber der Kontrolle zu bewirken (siehe Tabelle 6). Durch diese Experimente kann nicht eindeutig entschieden werden, ob die citratbedingte Wachstumsförderung auf dessen Rolle als C- oder als Fe-Quelle zurückzuführen ist. Daß erst höhere Citratkonzentrationen das Wachstum deutlich stimulieren, spricht für die Verwertung des Citrats als C-Quelle.

Das Wachstum in Gegenwart von DHB (nach 42 Stunden bei 0,05 mM DHB, OD = 0,42) unterschied sich von der Kontrolle (OD = 0,37) nicht wesentlich. Die Kombination 5 mM Citrat/0,02 mM DHB brachte kein besseres Wachstum als mit 5 mM Citrat allein. 0,1 mM DHB, eine relativ hohe Konzentration, führte lediglich zur Verdreifachung des Wachstums in Anwesenheit der gleichen Bipyridylkonzentration (vgl. Tabelle 6).

3.6.2. Aerober Transport nach anaerobem Wachstum

Die drei Eisentransportsysteme zeigten unterschiedliche Aufnahmeaktivitäten bei anaerob angezogenen AB2847-Zellen (siehe unten). Während signifikante Eisenaufnahme, die durchaus mit aerob angezogenen Zellen vergleichbar war, mit Ferrichrom und DHB gemessen wurde, konnte kaum nennenswerte Aufnahme mit Citrat gefunden werden, ganz gleich, ob die Zellen mit (1 - 30 mM) oder ohne Citrat gewachsen waren (Abb. 36). Im Folgenden wird auf die Eisentransportsysteme im Einzelnen eingegangen.

3.6.2.1. Das Enterochelinsystem

Experimente mit der hemA-Mutante E. coli K12 1004C gaben den Hinweis darauf, daß Enterochelin unter anaeroben Bedingungen nicht synthetisiert wird. HemA-Mutanten können kein Häm (d. h. keine Cytochrome) synthetisieren, wenn dem Wachstumsmedium keine δ-Aminolävulinsäure zugesetzt wird.

Eine anaerobe hemA-Kultur zeigte keine Eisenaufnahme, wenn radioaktives ^{55}Fe mit NTA ins Medium zugegeben wurde. Erhielten die Zellen jedoch zusätzlich Enterochelin von außen, so war eine sehr gute Eisenaufnahme zu verzeichnen. DHB konnte in diesem Experiment das Enterochelin nicht ersetzen (Abb. 33). Obwohl die Genorte für Enterochlinsynthese und -aufnahme bei der hemA-Mutante intakt waren, konnte sie offensichtlich während des anaeroben Wachstums kein Enterochelin ins Medium ausscheiden. Sie konnte auch kein Enterochelin aus DHB synthetisieren, was möglicherweise auf eine defekte oder mangelhafte aerobe Atmungskette zurückzuführen ist. Auf jeden Fall scheint die Aufnahme von Eisen-Enterochelin nicht beeinträchtigt zu sein.

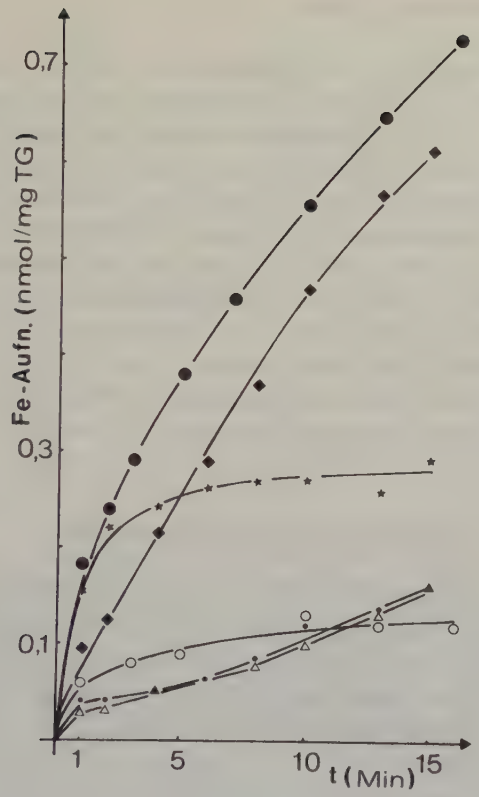


Abb. 33: Eisenaufnahme bei einer hemA-Mutante von E. coli K12 (1004C), angezogen in M9-Medium unter anaeroben Bedingungen. Um feststellen zu können, ob Enterochelin synthetisiert und ins Medium ausgeschieden war, wurden einer 10 ml Zellsuspension ohne sie abzuzentrifugieren und ohne sie zu waschen, 0,1% Glucose und 0,1 mM NTA zugesetzt und mit 1 µM $^{55}FeCl_3$ der Transport gestartet (○). Folgende Transporte wurden, wie unter 2.9 beschrieben ist, durchgeführt: (●) Eisen-Enterochelintransport (Enterochelin 2 µM, ^{55}Fe 1 µM), (•) Eisen-DHB- , (◆) Eisen-Ferrichrom-, (△) Eisen-Citrat- und (★) niedrig affiner Eisentransport (ohne Chelatorzusatz).

3.6.2.2. Das Ferrichromsystem

Anaerob angezogene aroB- und hemA-Mutanten zeigten unter aeroben Bedingungen normale Eisenaufnahme mit Ferrichrom (Abbildungen 33 - 36). Die Konstitutivität des Ferrichromsystems scheint demnach unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen erhaltbar. Ob die Zellen jedoch unter anaeroben Bedingungen vom Ferrichrom als Eisenquelle Gebrauch machen können, darüber liegen keine Informationen vor. Wachsende Zellen nehmen Ferrichrom-Eisen nach Transfer vom anaeroben zum aeroben Wachstum sofort auf. Die Aufnahme wird durch Zusatz von Chloramphenicol nicht gehemmt (siehe 3.5.2.3.2, Abb. 35). Dies zeigt, daß keine de novo Proteinsynthese, d. h. keine Induktion auf Genebene, erforderlich war.

3.6.2.3. Das citratabhängige Eisentransportsystem

Nachdem die Initiation der Induktion des Eisen-Citrattransportsystems unter anaeroben Bedingungen nicht gelungen war (Abb. 36a), stellte sich die Frage, ob das aerob induzierte System nach anschließender anaerober Wachstumsphase in Anwesenheit von Citrat aufrecht erhalten bleibt.

3.6.2.3.1. Aufrechterhaltung nach anaerobem Wachstum

Abb. 34 zeigt, daß aerobe Induktion nach anaerobem Wachstum nicht erhalten bleibt. Wenn eine aerob induzierte AB2847-Kultur in ein frisches citrathaltiges (1 oder 2 mM) M9-Medium überimpft und für mindestens vier weitere Generationen anaerob gezüchtet wurde, ging die citratabhängige Eisenaufnahme auf das Niveau nicht induzierter Zellen zurück (A). Wurde anschließend ein Teil dieser anaeroben Zellen im selben Medium für 1,5 Stunden aerob weiter inkubiert, so wurde das Eisen-Citratsystem ohne erneute Citratzugabe reinduziert

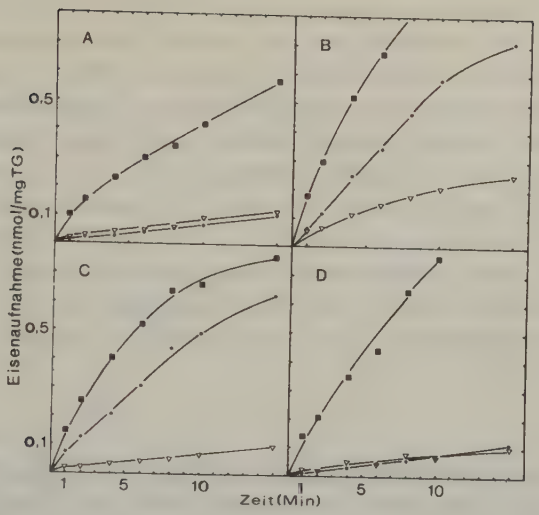


Abb. 34: Verlust der Induktion des Eisen-Citrattransportsystems nach anaerobem Wachstum in Anwesenheit von Citrat und die Notwendigkeit von Citrat für erneute Induktion unter aeroben Bedingungen. Aus einer mit 1 mM Citrat aerob angezogenen Kultur von AB2847 (induziert) wurde eine mit 2 mM Citrat versehene Kultur angesetzt und anaerob für 4 - 5 Generationen inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen geerntet, gewaschen und für die Bestimmung der Eisenaufnahme (A) verwendet. Ein anderer Teil wurde für 1,5 Stunden aerob weiter inkubiert und für die Eisenaufnahme (B) eingesetzt. Der dritte Teil wurde in M9-Salzen steril gewaschen, um Citrat zu entfernen, und wieder in zwei Teile geteilt und ebenfalls 1,5 Stunden aerob inkubiert: (C) wurde 1 mM Citrat zugesetzt und (D) ohne Citrat. (•) Citratabhängige, (■) Ferrichrom- und (▽) NTA-Eisenaufnahme.

(Eisen-Citrataufnahme, B), was so gedeutet werden müßte, daß das Citrat während beider Wachstumsphasen nicht verbraucht wurde oder zumindest so viel davon übrig geblieben war, daß es für eine erneute Induktion in der aeroben Phase ausreichte. Daß der oben gemessene Eisen-Citrattransport das Ergeb-

nis einer erneuten spezifischen Induktion und nicht einfach einer allgemeinen Anpassung an den aeroben Stoffwechsel war, wird in (C) und (D) verdeutlicht. Wurde das Citrat nämlich durch Abzentrifugieren und Resuspendieren der anaeroben Zellen (A) in ein frisches Medium entfernt, die neue Suspension in zwei Teile, C mit 1 mM und D ohne Citrat, geteilt und beide Teile (C) und (D) aerob weitere 1,5 Stunden inkubiert, so zeigte nur der erste, citrathaltige Teil (C) eine normal induzierte Eisen-Citrataufnahme. Zur Kontrolle wurden jedesmal der Ferrichrom- und der NTA-Eisentransport bestimmt. Unter allen Bedingungen war das Ferrichromsystem präsent (Abb. 34).

3.6.2.3.2. Zeitlicher Verlauf der aeroben Induktion mit Citrat nach anaerobem Wachstum und die Notwendigkeit einer de novo Proteinsynthese

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, daß anaerob kultivierte AB2847-Zellen nicht in der Lage waren, unmittelbar nach Transfer zu einer aeroben Atmosphäre Eisen über das Citratsystem aufzunehmen, ungeachtet dessen, ob sie während der anaeroben Phase oder davor mit oder ohne Citrat gewachsen waren. Voraussetzung für eine erneute Eisenversorgung über Citrat stellte eine aerobe Wachstumsphase in Anwesenheit von Citrat dar. Der zeitliche Verlauf der Induktion des Eisen-Citratsystems wrude über die Eisen-Citrataufnahme verfolgt (Abb. 35). Die Eisenaufnahme setzte erst nach 40 - 50 Minuten Anlaufphase ein. Der Zusatz von 40 µg Chloramphenicol/ml hemmte die Induktion, was mit der Notwendigkeit einer de novo-Proteinsynthese für die Induktion des Eisen-Citratsystems erklärt werden muß. Anaerobe Zellen benötigten mindestens die doppelte bis dreifache Induktionszeit wie nicht induzierte aerobe Zellen (ca. 20 Minuten).

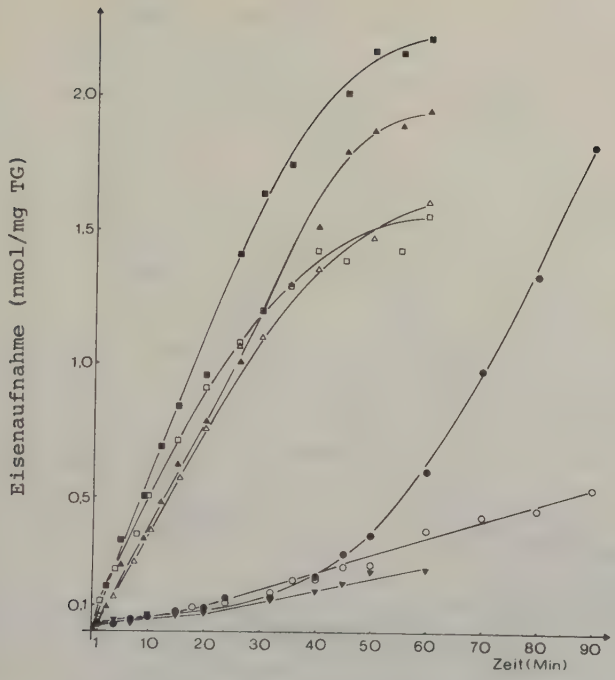


Abb. 35: Induktion des citratabhängigen Eisentransportsystems bei AB2847-Zellen, die anaerob in Anwesenheit von 1 mM Citrat angezogen wurden, im Vergleich mit dem Ferrichrom- und dem DHB- (Enterochelin-)eisentransportsystem. Die Zellen wurden nach dem Ernten in EAM, das alle für das Wachstum erforderlichen Zusätze und 100 µM NTA (geschlossene Symbole) oder zusätzlich 40 µg Chloramphenicol/ml (offene Symbole) enthielt, resuspendiert. Die Ansätze wurden 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, und zum Zeitpunkt Null wurden die Transporte mit jeweils 1 µM $^{55}Fe^{3+}$ und 1 mM Citrat (●) und (○), 1 µM Desferri-Ferrichrom (■) und (□), 20 µM DHB (▲) und (△) oder 100 µM NTA (▼) gestartet, und in den angegebenen Zeitabständen wurden Proben entnommen und über Membranfilter abgesaugt und gewaschen wie in 2.9.

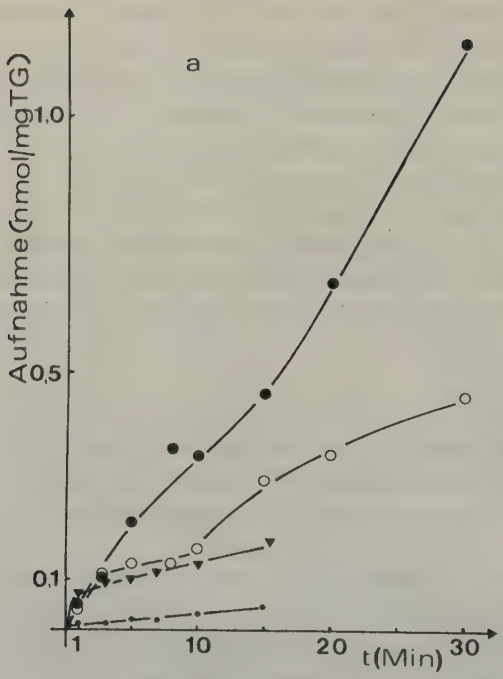


Abb. 36a: ^{14}C-Citrat-, Eisen-Citrat- und Eisen-Ferrichromaufnahme bei E. coli AB2847 nach anaerobem Wachstum in Anwesenheit von 10 mM Glucose und 30 mM Citrat. (1,5-^{14}C)-Citrat war in einer Konzentration von 25 µM (○) oder mit Zusatz von 0,1% Glucose (●) im Transportansatz. Die Ansätze enthielten 100 µM NTA und 1 µM $FeCl_3$. Die Eisen-Citrat- (•) und Eisen-Ferrichromaufnahme (▼) wurden wie üblich in Anwesenheit von 1 mM Citrat bzw. 1 µM Desferri-Ferrichrom und jeweils 1 µM $^{55}Fe^{3+}$, 100 µM NTA und 0,1% Glucose gemessen.

Abb. 35 zeigt ferner, daß die Ferrichrom- und DHB-Eisenaufnahme sofort nach Zugabe des ^{55}Fe mit dem entsprechenden Chelator starteten und die Aufnahmeraten durch Chloramphenicol unbeeinflußt blieben. Durch Hemmung des Wachstums bewirk-

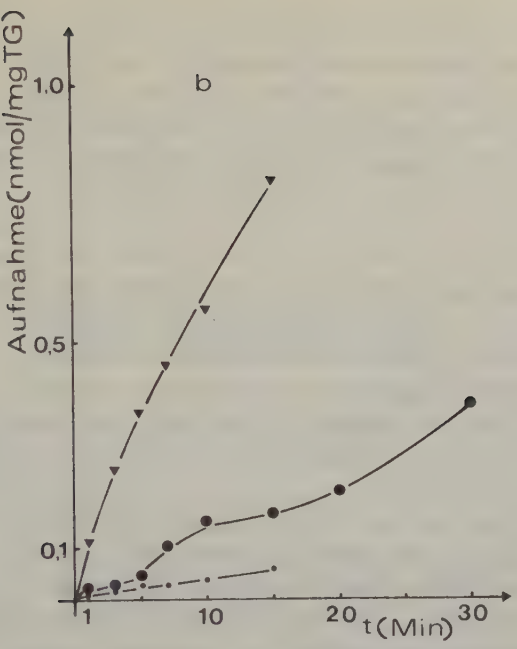


Abb. 36b: ^{14}C-Citrat-, Eisen-Citrat- und Eisen-Ferrichrom-aufnahme bei E. coli AB2847 nach anaerobem Wachstum in Anwesenheit von 10 mM Glucose (ohne Citrat). Symbole wie in Abb. 36a.

te Chloramphenicol lediglich eine schnellere Eisensättigung der Zellen im Vergleich zu den wachsenden Zellen.

3.6.2.3.3. ^{14}C-Citrataufnahme nach anaerobem Wachstum

E. coli AB2847, anaerob in M9-Medium in Anwesenheit von 30 mM (0,5%) Citrat und 10 mM (0,2%) Glucose als C-Quelle gewachsen, zeigte unter aeroben Bedingungen eine relativ hohe ^{14}C-Citrataufnahmeaktivität (Abb. 36a). Die Menge aufgenom-

menen Citrats nach 30 Minuten bewegte sich zwischen 0,72 und 1,14 nMol pro mg Trockengewicht in Anwesenheit von 25 µM Citrat und 0,1% Glucose im Test. Die Abb. 36a zeigt ferner, daß die Citrataufnahme auf 0,5 nMol/mg Tg. und 30 Minuten herabgesetzt wurde, wenn Glucose aus dem Aufnahmetest weggelassen wurde.

Das Eisen-Citrattransportsystem wurde unter diesen Bedingungen jedoch nicht induziert, und auch Ferrichrom-Eisenaufnahme konnte kaum gemessen werden. Eine parallele Kultur mit 10 mM Glucose aber ohne Citratzugabe zeigte eine normale Ferrichrom-Eisenaufnahme, jedoch keine Eisen-Citrataufnahme. Die ^{14}C-Citrataufnahme war reduziert (Abb. 36b). Der biphasische Verlauf der Citrataufnahme ist bemerkenswert.

Diese Befunde machen es notwendig, die Aufnahmebedingungen für Citrat zu optimieren, und diese Aufnahme sowie die citratabhängige Eisenaufnahme unter anaeroben Bedingungen zu studieren. Die citratabhängige Eisenaufnahme ist offensichtlich von einer Citrataufnahme unabhängig. Letztere scheint unter anaeroben Bedingungen induzierbar und durch Glucose stimulierbar zu sein. Unter anaerobem Wachstum in Gegenwart von Citrat und Clucose induziert E. coli die citratspaltende Citratlyase, die eine Verwertung von Citrat mit Glucose als Cosubstrat ermöglicht (71).

3.7. Ascorbatabhängiger Eisentransport bei E. coli

Die Entdeckung des ascorbatabhängigen Eisentransports hängt unmittelbar mit dem Befund zusammen, daß das Eisen-Citrattransportsystem und die Enterochelinsynthese unter anaeroben Bedingungen nicht bestanden. Als Ursachen für das Nichtbestehen dieser Systeme wurden die Löslichkeit des unter anaeroben Bedingungen möglicherweise vorwiegenden FeII und dessen leichtere Diffusion oder dessen Benötigung anderer

Komplexbildner als die eingesetzten diskutiert. Diese Annahme sollte anhand der Induzierbarkeit des Eisen-Citratsystems in Anwesenheit von Citrat und Fe^{2+} in einer O_2-haltigen Atmosphäre überprüft werden. Dazu sollte die reduzierende Eigenschaft von Ascorbat ausgenützt werden. Aus dieser Überlegung heraus entstanden folgende experimentelle Ergebnisse:

3.7.1. Induktion des citratabhängigen Eisentransports in Anwesenheit von Citrat und Ascorbat

In Anwesenheit von je 1 mM Citrat und Ascorbat in M9-Medium gewachsene E. coli AB2847-Zellen zeigten eine normal induzierte Eisenaufnahme. Die Kontrolle, mit 1 mM Ascorbat allein gewachsen, zeigte keine citratabhängige Eisenaufnahme. Da aber die Ascorbatkonzentration (1 mM) zu gering erschien, um das Eisen während der gesamten Inkubationszeit (ca. 6 Stunden) in reduzierter Form zu halten, wurde das Experiment mit 1 mM Citrat unter Erhöhung der Ascorbatkonzentration auf 1% (ca. 57 mM) und Verkürzung der Inkubationszeit auf 2 Stunden reproduziert. Die Schlußfolgerung lautet: Citrat induziert das Citratsystem in Anwesenheit von Ascorbat und vielleicht in Anwesenheit von Fe^{2+}, vorausgesetzt daß Ascorbat trotz der entgegengesetzten katalytischen Wirkung von Citrat und Phosphat des Mediums auf die Autoxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch den Luftsauerstoff (47) doch Fe^{3+} zu Fe^{2+} überführt hatte. Ferner ist die Induktion in Gegenwart von Citrat und Ascorbat allein auf Citrat zurückzuführen, Ascorbat induzierte das Eisen-Citratsystem bei der Kontrolle nicht.

3.7.2. Ascorbat stimuliert die Eisenaufnahme

Kontrollexperimente, die die Wirkung des Ascorbats auf die citratabhängige Eisenaufnahme zeigen sollten, wenn beide Substanzen den Zellen gleichzeitig angeboten werden, zeigten,

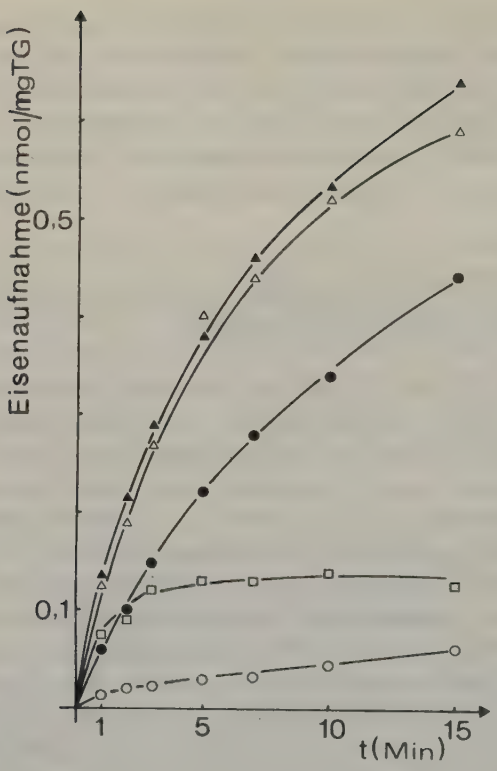


Abb. 37: Induktion des citratabhängigen Eisentransportsystems durch Citrat in Anwesenheit von Ascorbat und die Wechselwirkung zwischen beiden Substraten, wenn sie gleichzeitig dem Aufnahmetest zugesetzt werden. Mit AB2847-Zellen, die in Anwesenheit von 1 mM Ascorbat in M9-Medium angezogen waren, wurden die Eisen-Citrataufnahme (○) und die Aufnahme in Anwesenheit von je 1 mM Citrat und Ascorbat (△) gemessen. Ebenfalls in AB2847-Zellen, die jedoch in Anwesenheit von 1% Ascorbat und 1 mM Citrat gewachsen waren, wurden die gleichen Aufnahmeansätze, citratabhängige (●) und ascorbatabhängige (▲) sowie NTA-Eisenaufnahme (□),getestet.

daß die Aufnahme mit Citrat und Ascorbat bei induzierten Zellen fast doppelt so hoch wie die Aufnahme mit Citrat allein war, und daß bei nicht induzierten Zellen eine sehr gute Eisenaufnahme zu beobachten war (Abb. 37). Durch das Weglassen von Citrat aus dem Aufnahmetest wurde nachgewiesen, daß Ascorbat selbst eine Stimulierung der Eisenaufnahme unabhängig von Citrat und dem Vorwachstum (mit oder ohne Citrat oder Ascorbat) bewirkte.

Weitere Experimente ließen folgende Eigenschaften des ascorbatabhängigen Eisentransports feststellen:

1. Er ist konstitutiv, benötigt weder Citrat noch Ascorbat im Vorwachstum, um induziert zu werden.
2. Er ist wahrscheinlich energieabhängig, denn er wird durch Glucose stimuliert. In Abwesenheit von Glucose ist die Aufnahme um die Hälfte reduziert (Abb. 38).
3. Die Eisenaufnahme ist abhängig von der Ascorbatkonzentration. Folgende Konzentrationen wurden getestet: 0,01, 0,1 und 1 mM. Die Eisenaufnahme nahm mit der Ascorbatkonzentration zu (Abb. 38). Eine genauere Bestimmung der Affinität (k_m-Wert) wurde nicht versucht.
4. Abb. 38 zeigt, daß die Ascorbatabhängige Eisenaufnahme von der tonB-Funktion unabhängig ist. Es wurde auch keine Abhängigkeit von den TonA- und FecA-Proteinen gefunden. Die Aufnahme bei P8 und AN299 (nicht gezeigt) waren wie bei AB2847. Damit ist dieses Aufnahmesystem von den anderen hochaffinen Fe^{3+}-Aufnahmesystemen verschieden.
5. E. coli AB2847 kann simultan über Citrat und Ascorbat Eisen aufnehmen, wenn beide gleichzeitig angeboten werden. Die Aufnahme entsprach nicht ganz der Summe beider Systeme, lag aber höher als mit jeweils Citrat und Ascorbat allein. Ähnliches wurde für DHB und Ascorbat gefunden (nicht gezeigt). Bei nicht induziertem Eisen-Citratsystem wurde keine Komptetion der Eisen-Ascorbataufnahme durch Citrat beobachtet (Abb. 37).

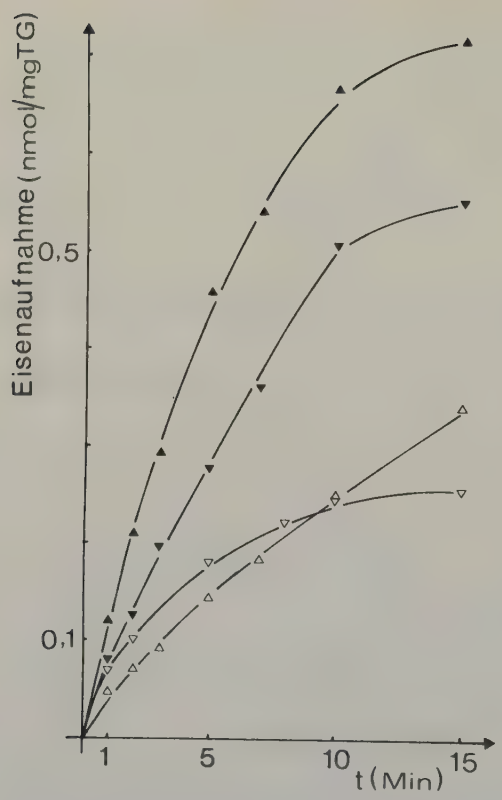


Abb. 38: Eisentransport in Anwesenheit von verschiedenen Ascorbatkonzentrationen und die Wirkung von Glucose auf den Transport. Die dargestellten Ergebnisse wurden mit dem Stamm BR158 (tonB-Mutante) erzielt (die gleichen Ergebnisse konnten auch mit AB2847 - nicht dargestellt - erreicht werden). Die Aufnahmetests enthielten 0,1 mM NTA, 1 µM $^{55}Fe^{3+}$ und 1 mM Ascorbat (△) oder zusätzlich 0,1% Glucose und entweder 1 mM (▲) oder 0,1 mM (▼) oder 0,01 mM (▽) Ascorbat.

4. DISKUSSION

4.1. Induktion von außen

Das citratabhängige Eisentransportsystem unterscheidet sich von den anderen beiden hochaffinen Transportsystemen, Enterochelin und Ferrichrom, darin, daß es zusätzlich zu den Eisenmangelbedingungen die Anwesenheit eines Induktors im Wachstumsmedium für seine Induktion benötigt. Die Synthese des Eisen-Citrat-Transportsystems wird induziert, denn Chloramphenicol verhindert durch Hemmung der Proteinsynthese die Induktion sowohl mit Citrat (Abb. 5A und 35) (34) als auch mit Fluorocitrat (Abb. 5B).

Sämtliche untersuchten Carbonsäuren, darunter citratanaloge Substanzen, konnten mit Ausnahme von Fluorocitrat keine Eisen-Citrataufnahme induzieren, was für eine hohe Spezifität spricht (siehe 3.1.1). Isocitrat, Trikarballylat und cis-Aconitat, die nur sehr geringe strukturelle Unterschiede zum Citrat aufweisen, zeigen durch ihr Versagen als Induktoren besonders die hohe Spezifität. Auch der Eisen-Citrattransport besitzt eine sehr hohe Ligandenspezifität. Selbst Fluorocitrat kann Citrat im Eisenaufnahmetest nicht ersetzen. Die hohe Spezifität des Systems könnte mit den unterschiedlichen Strukturen der Komplexe, die die getesteten Substanzen mit Eisen bilden, erklärt werden. Darüber liegen jedoch wenig Informationen vor. Man kann nur indirekt aus der Literatur entnehmen, daß z.B. cis-Aconitat während der Katalyse der Reaktion Citrat $\rightleftharpoons$ Isocitrat durch die Aconitase in zwei Konformationen im Komplex mit dem Fe^{2+} des katalytischen Zentrums des Enzyms vorkommt, einer citrat- und einer isocitratähnlichen (37, 78). Ähnliches wird bei der Inhibierung und der anschließenden Inaktivierung der Aconitase durch Fluorocitrat angenommen (15). Wahrscheinlich bildet das Citrat unter den Induktions- und Transportbedingen einen Dicitrat-Eisenkomplex (siehe Anhang) (104). Es ist denkbar, daß

Fluorocitrat einen ähnlichen Komplex bildet, der induziert, möglicherweise auch transportiert, aber das Eisen vielleicht nicht mehr freigesetzt wird, ähnlich wie bei der Inhibierung der Aconitase durch Fluorocitrat, wo es wie Citrat als Ligand an Eisen gebunden wird, während das Enzym den anderen Liganden in einem "Heterokomplex" (Fluorocitrat-Eisen-Enzym) darstellt. Diese Analogie sagt jedoch nichts aus über den Wirkort oder den Reaktionspartner des Induktors in E. coli bei der Induktion des Eisen-Citrattransports.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse machen eine Reaktion in der Zelle unwahrscheinlich. Unter aeroben Bedingungen konnte zwar nicht ausgeschlossen werden, daß doch Citrat in die Zelle über einfache Diffusion gelangt, jedoch erfolgt keine Akkumulation auf Grund aktiver Aufnahme (siehe 3.1.2.1 bis 3.1.2.3). Eine geringe Citrataufnahme wird zwar beobachtet, sie steht aber nicht mit dem Eisentransport in einem korrelierbaren Verhältnis. Angenommen, der ganze Eisen-Citratkomplex wird aufgenommen, dann sollte mindestens genau so viel Citrat oder doppelt so viel wie Eisen in die Zelle gelangen, wenn man berücksichtigt, daß ein Eisen-Dicitrat-Komplex vorliegt.

Die hemmende Wirkung von Fluorocitrat auf die Aconitase verschiedener, sowohl eu- als auch prokaryotischer, Herkunft ist nachgewiesen. Für die Inhibierung tierischer Aconitase reichen 10 µM Fluorocitrat aus (31). Fluorocitrat wurde für die Untersuchung der Citrataufnahme bei citratverwertenden Bakterien eingesetzt, um den Citronensäurezyklus zu unterbrechen und damit die Anreicherung von Citrat messen zu können. Mit dieser Methode konnten Lowford und Williams (65) die Citrataufnahme bei Pseudomonas bzw. Kay und Cameron (59) bei Salmonella typhimurium messen. Letztere konnten Citrataufnahme-defekte Mutanten als Resistente gegen Fluorocitrat selektionieren, was auf gemeinsames Aufnahmesystem für beide Substrate schließen läßt.

Fluorocitrat hemmt das Wachstum von E. coli AB2847 nicht. In Kooperation mit Citrat stimuliert es sogar das Zellwachstum unter Eisenmangelbedingungen (siehe 3.1.1.2). Diese Beobachtungen stimmen mit der Eigenschaft von Fluorocitrat als Induktor für die citratabhängige Eisenaufnahme überein und zeigen die Aufnahmeresistenz von E. coli-Zellen gegen Fluorocitrat und Citrat. Vermutlich hemmt Fluorocitrat den Citronensäurezyklus bei E. coli, wenn es in die Zelle gelangt. Dies kann man aus der Hemmung des Wachstums von E. coli durch Fluoroacetat ableiten. Es hemmt die Pyruvatoxidation unter aeroben, jedoch nicht unter anaeroben Bedingungen (58). Fluoroacetat wird zu Fluoroacetyl-CoA aktiviert (5, 25, 75) und reagiert mit Oxalacetat mittels Citratsynthase zum Fluorocitrat, dem Aconitase-Inhibitor (sog. letale Synthese) (87). Als Folge der Hemmung durch Fluorocitrat tritt häufig eine Erhöhung des intrazellulären Citratspiegels auf (112). Dies ist der Fall, wenn E. coli AB2847 in Gegenwart von Fluoroacetat angezogen wird (Tabelle 3). Fluorocitrat im Wachstumsmedium bewirkte jedoch keine Veränderung am intrazellulären Citratspiegel (Tabelle 3), was darauf hinweist, daß es nicht aufgenommen wird. Wenn Citrat und Fluorocitrat nicht aufgenommen werden, stellt sich die Frage, wie diese Substrate die citratabhängige Eisenaufnahme induzieren.

Citrat ist ein Metabolit, der bei einer stoffwechselaktiven Zelle in großen Mengen entsteht und abgebaut wird. Die Bestimmung des intrazellulären Citratgehaltes zeigte immerhin eine hohe (5 mM) Konzentration, die für eine Induktion des citratabhängigen Eisentransports sehr gut reichen würde, wenn sie von außen angeboten wird. Andere Autoren konnten unter ähnlichen Bedingungen bis zu 12 mM Citrat in der Zelle messen (65). Das Wachstum in Gegenwart von induzierenden Mengen Citrats oder Fluorocitrats erhöhte den intrazellulären Citratgehalt nicht (Tabelle 3).

Würde das interne Citrat auf die Eisen-Citrataufnahme induzierend wirken, so würde das System konstitutiv exprimiert werden. Für die Zelle ist es aber ökonomischer, das Eisen-Citrattransportsystem zu regulieren, um es erst bei Bedarf zu bilden.

Hier wird ein Mechanismus benötigt, der die Synthese des Eisen-Citratsystems trotz Allgegenwärtigkeit des Citrats in der Zelle reguliert. Folgert man aus den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen eine Induktion von außen, so kann man die Befunde verstehen und sie mit der Ökonomie der Zelle in Einklang bringen. Auf Grund dessen muß man einen Mechanismus fordern, der zwischen intrazellulärem und von außen kommendem Citrat unterscheidet. Theoretisch gibt es mehrere Vorstellungen, die entweder einen Wirkort in der Zellhülle oder eine gewisse Kompartimentierung der Zelle postulieren (23). Es ist interessant, in diesem Zusammenhang zu erwähnen, daß der Wirkort von Phenäthylalkohol bei der Hemmung der DNA-Synthese bei E. coli in der Zellmembran vermutet wird (106). Eine Assoziation zwischen DNA und der Zellmembran von Bacillus subtilis wurde bereits nachgewiesen (36, 99).

Bis jetzt wurde für drei Prozesse eine Induktion von außen angenommen: Die Induktion des Hexose-6-Phosphattransports bei E. coli durch Glucose-6-Phosphat (51, 119, 120), des C-4-Dicarbonsäuretransports bei Azotobacter vinelandii durch die Substrate (Intermediate des Citronensäurezyklus) selbst (96) und der Morphogenese von Myxococcus xanthus durch Glycerol (99).

Das Eisen-Citrattransportsystem hat mit den beiden ersten Systemen gemeinsam, daß es sich beim Induktor um eine Substanz handelt, die dauernd in der Zelle vorhanden ist, ohne daß das entsprechende System induziert wird. Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Eisen-Citratsystem und den

beiden anderen liegt darin, daß Citrat nicht seine eigene sondern die Aufnahme des Eisens induziert. Die Induktion der Eisen-Citrataufnahme unterliegt dementsprechend einer doppelten Kontrolle, durch Citrat im Medium und Eisenmangel in der Zelle. Dies macht es zu einem komplexeren System.

Die Evidenzen dafür kommen aus den Experimenten mit Zellen, die in eisenreichen Medien in Anwesenheit von Citrat gewachsen waren und keine Eisenaufnahme zeigten (3.2.1 und 3.2.2.1). Auf der anderen Seite konnte die Eisen-Citrataufnahme in Anwesenheit von Desferri-Ferrichrom in relativ hoher Konzentration (30 µM) durch Citrat nicht induziert werden. Da diese Interaktion des einsenfreien Ferrichroms mit der Induktion des Eisen-Citratsystems sowohl am Stamm AB2847, wobei die Eisen-Ferrichromaufnahme nach dieser Behandlung normal war, als auch an der tonA-Mutanten, die keine Eisen-Ferrichromaufnahme zeigt, demonstriert werden konnte, ist sie weder durch die Annahme einer guten Eisenversorgung (durch Ferrichrom) noch durch einen extremen intrazellulären Eisenmangel (in der tonA-Mutane) zu erklären (3.2.2.2). Zieht man die hemmende Wirkung von DHB auf die Induktion bei der fepB-Mutante (siehe 3.2.3.2) in Betracht, die bei der fepA-Mutante nicht beobachtet wurde, wobei nur die fepA-Mutante sich über DHB mit Eisen versorgen kann, so wird deutlich, daß neben der Syntehse auch die Aktivität des Eisen-Citrattransportsystems reguliert wird. Die citratabhängige Eisenaufnahme erfolgt nicht in gut mit Eisen versorgten Zellen. Andererseits wird das Transportsystem ohne Bildung des Eisen-Citratkomplexes nicht induziert. Wenn das FecA-Protein ein Bestandteil des Eisen-Citrattransportsystems ist, was wahrscheinlich ist, und dieses Protein im eisenreichen Medium (10 µM) induziert wird, in der tonA-Mutante in Gegenwart von Desferri-Ferrichrom und Citrat jedoch nicht (111), so können diese Beobachtungen nur durch die Annahme erklärt werden, daß der Eisen-Citratkomplex als Induktor wirkt.

Um die Unterdrückung der Eisen-Citrataufnahme (wie der Ferrichromaufnahme und der Enterochelinsynthese) (84, 88) durch einsenreiche Medien zu erklären, muß man fordern, daß das System unter diesen Bedingungen zwar induziert, jedoch nicht aktiv ist. In diesem Punkt unterliegt das Eisen-Citratsystem der gleichen Regulation wie die anderen Eisenaufnahmesysteme.

Die Annahme eines Eisen-Citratkomplexes als Induktor trägt zum Verständnis der Induktion von außen bei. So kann man sich vorstellen, daß der Komplex mit einer Membrankomponente reagiert, die das Eisen spezifisch in die Zelle einschleust und an ein Regulatorprotein bringt. Dies kann ein Repressor sein, der vom Operator durch Konformationsänderung entfernt wird, oder ein Aktivator, der (sogar die Membrankomponente selbst sein kann und) erst nach Reaktion mit Eisen seine Affinität zum Operator erlangt und die Gentranskription erlaubt. Das Citrat des Zellpools liegt entweder eisenfrei vor, weil das intrazelluläre Eisen in der Fe^{2+}-Form und/oder an Enzymen und anderen Proteinen gebunden vorliegt, oder kann nicht an die postulierte Membrankomponente heran kommen, um das Eisenaufnahmesystem zu induzieren. Möglicherweise kommen das im Citronensäurezyklus entwickelte Citrat und der postulierte Regulator in gesonderten Zellkompartimenten vor.

Im extrahierten M9-Medium liegt die Konzentration des Eisens zwischen 0,05 und 0,4 µM (48, 76, 89). Auch sonst ist die ohne spezifische Transportsysteme verfügbare Eisenmenge in der Regel sehr gering. Die Anwesenheit ausreichender Mengen an Citrat im Wachstumsmedium ist zur Erhaltung des in Spuren vorhandenen Eisens im Komplex und für die Induktion des Systems notwendig. Dies kann vielleicht die relativ hohen Citratkonzentrationen, die für die Initiation der Induktion und ihre Aufrechterhaltung benötigt werden, erklären.

Die Induktion der Citrat-abhängigen Eisenaufnahme unterscheidet sich von der Induktion der β-Galaktosidase (18) und ähnelt der des Hexose-6-Phosphat-Transportsystems (120), indem sie weder eine Autokatalyse noch eine Aufrechterhaltung durch geringe Citratkonzentrationen aufweist (siehe 3.1.4.2.2). Beide Eigenschaften bedingen sich gegenseitig und treten immer auf, wo eine aktive Permeation und Anhäufung des Induktors in die Zelle, wie im Falle des Lac-Operons, beobachtet werden. β-Galaktosidpermease-Mutanten zeigen im Gegensatz zum Wildtypstamm keine Autokatalyse und keine Aufrechterhaltung (17, 18). Das Fehlen der Autokatalyse kann grundsätzlich auch durch die Lokalisation des primären Wirkorts des Induktors an oder in der Membran oder allgemein, wo der Induktor ohne aktiven Transport an diesen Wirkort gelangen kann, letzten Endes eine Konstanz der effektiven Induktorkonzentration bedeutet, verursacht sein. Es ist auch denkbar, daß ein Induktor die Induktion trotz Autokatalyse nicht aufrecht erhalten kann, wenn er durch Verbrauch während des Zellmetabolismus nicht verfügbar bleibt.

Da E. coli einen vollständigen Citronensäurezyklus besitzt, ist es denkbar, daß Citrat, falls aufgenommen, katabolisiert wird. Die Diffusion von Citrat in geringen Mengen in die Zelle und damit dessen Verbrauch können nicht ausgeschlossen werden. Daher kann die Ausverdünnung des Eisen-Citratsystems während des Wachstums auf geringen Citratmengen nicht ohne jegliche Bedenken auf das Fehlen der Autokatalyse zurückgeführt werden. Die Aufrechterhaltung kann an kontinuierlichen Kulturen im Chemostaten präziser studiert werden, da die gewünschte Citratkonzentration durch kontinuierliche Zufuhr konstant gehalten und somit das Problem des Verbrauchs ausgeschaltet werden kann.

4.2. Weitere Charakterisierung des citratabhängigen Eisentransports

Die Experimente mit Zellen von AB2847, die in Anwesenheit von verschiedenen C-Quellen (siehe 3.3) durch Citrat induziert waren, offenbaren eine Unabhängigkeit sowohl der Induktion als auch der Aufnahme von einer Katabolitrepression durch Glucose. Damit ähnelt das Eisen-Citratsystem dem Ferrichromsystem bei E. coli (26). Da auch die Citrataufnahme bei solchen Zellen nicht besser war als bei auf Glucose gewachsenen Zellen, ist die Katabolitrepression als Ursache für die Eindringungsresistenz von E. coli gegen Citrat ausgeschlossen und eher auf das Fehlen eines Aufnahmesystems zurückzuführen. Die citratabhängige Eisenaufnahme bei E. coli ist völlig anders als die Citrataufnahme bei anderen Enterobacterien wie Salmonella typhimurium (59), das keine citratabhängige Eisenaufnahme aufweist (53, 97). Young et al. (122) vermuteten eine citratabhängige Eisenaufnahme bei Aerobacter aerogenes, weil Citrat die DHB-Synthese hemmte. A. aerogenes besitzt ein induzierbares Citrataufnahmesystem und kann auf Citrat als einziger C-Quelle wachsen (110, 115). Es wäre interessant, das Verhältnis zwischen beiden Aufnahmesystemen bei diesem Organismus zu erfahren, jedoch liegt keine weitere Bestätigung der citratabhängigen Eisenaufnahme vor. Es stellt sich die Frage, ob die Beobachtung von Young et al. wohl auf die Synthese von Aerobactin (Hydroxamat aus der Citratfamilie) aus Citrat zurückzuführen ist, das dann die DHB-Synthese unterdrückte? Neulich sind E. coli-Stämme isoliert worden (55, 103), die in der Lage sind, Citrat als C-Quelle zu verwerten. Da die Verwertung von Citrat seine Aufnahme voraussetzt, bieten diese Stämme eine Möglichkeit an, die Beziehung zwischen Citrat- und Eisen-Citrataufnahme in E. coli zu untersuchen.

Der citratabhängige Eisenaufnahmemechanismus bei E. coli muß auch gegen den Cotransport-Mechanismus von Citrat und Mg^{2+}, der für das Gram-positive Bakterium Bacillus subtilis beschrieben wurde (77, 85, 116), abgegrenzt werden; denn in diesem Fall werden Mg^{2+} und Citrat in annähernd äquimolarem Verhältnis in die Zelle eingeschleust (116).

Ein Mechanismus, der der Eisen-Citrataufnahme bei E. coli gerecht wird, muß die Diskrepanz zwischen Citrat- und Eisenaufnahme erklären können. Der erste Schritt in diesem Mechanismus ist die Bindung des Eisen-Citrat-Komplexes an den Rezeptor der äußeren Membran (FecA-Protein). Dort oder in einem nachgeschalteten Schritt wird das Eisen ohne das Citrat an weitere Akzeptoren abgegeben.

Der Eisen-Citrat-Transport wird stark gehemmt durch Behandlung der Zellen mit Pronase (Abb. 27, 28). Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer intakten äußeren Membran für die Eisen-Citrataufnahme. Daß mehrere Proteine (darunter das FecA-Protein) nach solcher Behandlung von der äußeren Membran fehlen (Abb. 30), läßt Schlüsse über die spezifische Rolle des FecA-Proteins nicht zu. Die Verdauung durch Pronase ist jedoch nicht so gravierend, wenn die Behandlung in Hepes- (111) oder in Tris-Puffer (95) anstatt im hier verwendeten Phosphatpuffer (EAM) durchgeführt wird. Die DHB- und Ferrichrom-Eisenaufnahme waren weniger empfindlich für die Behandlung mit Pronase (Abb. 27). Ferrichrom kann sogar an TonA vorbei transportiert werden (Abb. 28). Durch die proteolytische Wirkung von Pronase wird die äußere Membran zwar so durchlässig, daß die Barriere ohne Hilfe des Rezeptors (TonA) überwunden wird, die Ferrichromaufnahme bleibt jedoch von der tonB-Funktion abhängig (Abb. 29). Diese Gegenüberstellung verdeutlicht, daß ein entscheidender Schritt in der Eisen-Citrataufnahme in der äußeren Membran lokalisiert ist.

In in vitro Experimenten wurde gezeigt, daß Citrat die Bindung von Eisen an die äußere Membran stimuliert, wenn diese

Membran aus induzierten Zellen gewonnen war (111). Wenn die Membran aus nicht induzierten Zellen oder aus FecA-Mutanten stammt, denen das Protein der äußeren Membran (FecA) fehlt, wird eine wesentlich geringere, insignifikante Bindung gefunden. Dies sind Evidenzen für die Funktion des FecA-Proteins als Rezeptor des Eisen-Citrat-Komplexes.

Die Hemmung des Eisen-Citrattransports durch N-Äthylmaleinimid weist auf die Involvierung von SH-Gruppen im Aufnahmemechanismus hin (Bindung und Dekomplexierung durch Bildung von Schwefel-Eisen-Komplex?).

Der zweite Schritt im Aufnahmemechanismus muß an Bindeproteinen des periplasmatischen Raums gekoppelt sein: Mit osmotischem Schock behandelte Zellen verlieren die Fähigkeit, Eisen über Citrat aufzunehmen (3.5.3). Ferner wurde eine Bindung von ^{55}Fe (angeboten im Citratkomplex) an konzentrierten periplasmatischen Proteinen beobachtet. Lo (67) erwähnte, daß auch manche Proteine der äußeren Membran nach der Schockbehandlung in der Schockflüssigkeit gefunden werden. Dies scheint beim FecA-Protein jedoch nicht der Fall zu sein, weil kein äquivalentes Protein in der Schockflüssigkeit durch Analyse mit der Gelelektrophorese gefunden wurde. Eine Analyse der Membran nach dem Schock steht noch aus.

Die Citrat-abhängige Eisenaufnahme hat ein Optimum zwischen pH 6 und 7 (Abb. 26), was für mehrere Aktiv-Transportsysteme charakteristisch ist (14, 59, 115). Hier unterscheidet sich das Eisen-Citratsystem wieder vom Ferrichromsystem, das ein Optimum über einen breiteren Bereich aufzeigt (26). Ein ähnliches Verhalten wie das des Citratsystems wurde für die Eisenaufnahme über Rhodotorulasäure bei der Hefe Rhodotorula pilimanae beschrieben (14). Dieses Aufnahmesystem stimmt mit dem Eisen-Citratsystem ebenfalls darin überein, daß nur das Eisen ohne den Komplexbildner aufgenommen wird.

4.3. Anaerobes Wachstum und Eisentransport

Nach Transfer zu aeroben Bedingungen transportieren anaerob gewachsene Zellen von E. coli AB2847 sofort Eisen über Ferrichrom und DHB (=Enterochelin). Eine Induktion unter aeroben Verhältnissen ist für die Funktion beider Systeme nicht notwendig und auch keine besondere Umstellung des Stoffwechsels. Dies geht aus den Aufnahmeexperimenten unter Bedingungen, die das Wachstum nicht erlauben (Fehlen der auxotrophen Aminosäuren oder Zusatz von CAN) (Abb. 35), hervor. Auch unter Wachstumsbedingungen wird die Aufnahme sofort nach Eisenzugabe mit dem entsprechenden Chelator gestartet (Abb. 35). Dies läßt den Schluß zu, daß die Gene, die die Funktion beider Systeme kontrollieren, unter anaeroben Bedingungen weitgehend exprimiert werden.

Eine direkte Bestimmung der Eisenaufnahme unter anaeroben Bedingungen wurde nicht unternommen. Die Wachstumsexperimente ließen jedoch keine signifikante Stimulierung erkennen, die auf die Funktion von DHB oder Citrat als Eisenchelatoren zurückzuführen wäre (Tabelle 6). Dies kann jedoch darauf beruhen, daß der Anteil an besser löslichem Fe^{2+} unter anaeroben Bedingungen dominiert. Dies würde bedeuten, daß die Eisenversorgung ohne Chelator erfolgen kann. Dies kann auch auf der Affinität der angebotenen Chelatoren zum Fe^{2+} beruhen, die schwächer als für Fe^{3+} ist. Dipyridyl hemmt das Wachstum von E. coli K12 sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Die durch Dipyridyl verursachte Hemmung kann unter aeroben Bedingungen durch Citrat oder DHB aufgehoben werden, unter anaeroben jedoch nicht (Tabelle 6). Dies kann mit der geringeren Affinität von Citrat und DHB zum Fe^{2+} oder damit zusammenhängen, daß sie unter anaeroben Bedingungen als Eisenquellen nicht verwertbar sind.

Enterochelin ist ein extrem starker Fe^{3+}-Komplexbildner, der Fe^{3+} bildet, wenn ihm Fe^{2+} angeboten wird (97). Über dessen

Aufnahme und Hydrolyse (durch die Fe^{3+}-Enterochelin-Esterase) unter anaeroben Bedingungen ist nichts bekannt. Rosenberg und Young (97) erwähnten eine unveröffentlichte Arbeit von Woodrow und Young, die besagt, daß Enterochelin unter anaeroben Bedingungen nicht synthetisiert wird. Die Beobachtungen an der hemA-Mutanten 1004C (siehe 3.6.2.1) stimmen mit deiser Mitteilung überein. Diese Mutante zeigte keine Eisenaufnahme, wenn $^{55}Fe^{3+}$ dem Wachstumsmedium zugesetzt wurde, was bedeutet, daß Enterochelin nicht im Medium war. 1004C kann dagegen von außen angebotenes ^{55}Fe-Enterochelin verwerten (Abb. 33). Es ist also eine Synthese- und keine Aufnahmehemmung. ^{55}Fe-Ferrichrom wird auch aufgenommen. Demnach sind anaerob angezogene Zellen in der Lage, diese Eisenkomplexe unter aeroben Bedingungen zu transportieren. Mit dem Eisen-Ctiratsystem sieht die Sache anders aus. Die Citrat-abhängige Eisenaufnahme wird nicht induziert, und das aerob induzierte System wird nach anaerobem Wachstum in Gegenwart von Citrat für ca. vier Generationen ausverdünnt und nicht erhalten (Abb. 34). Eine de novo-Proteinsynthese, die durch CAN unterdrückbar ist, ist eine Voraussetzung für eine citratabhängige Eisenaufnahme nach dem Wechsel von anaeroben zu aeroben Bedingungen. Die lag-Phase, bevor die Aufnahme erfolgt, ist mit 40 - 50 Minuten (Abb. 35) doppelt so lang wir die lag-Phase (ca. 20 Min.) bei der Induktion von aerob gewachsenen Zellen (Abb. 5A). Die citratabhängige Eisenaufnahme aufgrund ihrer Induktion ist stärker an die aeroben Bedingungen gekoppelt als die beiden anderen Systeme, Ferrichrom und Enterochelin. Vielleicht ist die Induktion des Eisen-Citratsystems in ihrer Abhängigkeit vom O_2 mit der Enterochelinsynthese vergleichbar.

Denkbare Ursachen für die Nicht-Induzierbarkeit des Eisen-Citrattransports unter anaerobem Wachstum können darin bestehen, daß ein Fe^{3+}-Citrat-Komplex, der unter anaerober Atmosphäre nicht verfügbar ist, als Induktor benötigt wird. Citrat hat höhere Affinität zu Fe^{3+} und katalysiert die Aut-

oxidation von Fe^{2+} durch den Luftsauerstoff (47). Eine zellökonomische Maßnahme kann auch in Erwägung gezogen werden, wenn tatsächlich Fe^{2+}-Aufnahme weniger aufwendig ist. Um zu erfahren, ob nur ein Induktionsproblem oder überhaupt ein das ganze System einschließlich der Aufnahme betreffendes vorliegt, ist es erforderlich, die Eisenaufnahme unter anaeroben Bedingungen bei aerob induzierten Zellen zu testen. Ferner müßten alle "aeroben" Eisentransport-Systeme unter anaeroben Bedingungen untersucht werden.

Citrat kann von E. coli unter anaeroben Bedingungen mit Glucose mitverwertet werden (71). Zu diesem Zweck wrid ein spezifisch citratspaltendes Enzym, die Citratlyase, induziert (114). Eine relativ gute, durch Glucose stimulierbare ^{14}C-Citrataufnahme (bis zu 1,4 nMol/mg Tg. und 30 Min.) wird bei anaerob gewachsenen Zellen gemessen (siehe 3.6.2.3.3). Ob es sich dabei um einen Co-Transport beider Substrate handelt, bleibt noch offen. Da die citratabhängige Eisenaufnahme unter diesen Bedingungen nicht induzeirt wird, muß sie als ein völlig anderer, von der Citrataufnahme unabhängiger Prozeß betrachtet werden. Beide Prozesse scheinen sich sogar, wenn man berücksichtigt, daß Salmonella über ein Citrataufnahme- (59) aber kein citratabhängiges Eisenaufnahmesystem (34, 53, 97) verfügt, gegenseitig auszuschließen. Dieser Befund unterstreicht, daß E. coli durchaus in der Lage ist, aus einem Eisen-Citrat-Komplex selektiv entweder das Metall oder den Komplexbildner aufzunehmen.

Es ist unwahrscheinlich, daß ein Verbrauch von Citrat während des anaeroben Wachstums für das Unterbleiben der Induktion verantwortlich ist, weil Zellen, die 1 mM Citrat erhalten und eine anaerobe Wachstumsphase durchmachen, unter aeroben Bedingungen ohne weiteren Zusatz von Citrat induziert werden (Abb. 34).

Der Versuch, mit Hilfe von Ascorbat (bis zu 1% im Medium) das Eisen des Mediums zu Fe^{2+} unter aeroben Bedingungen zu

reduzieren und die Wirkung auf die Induktion der citratabhängigen Eisenaufnahme zu studieren, war diesbezüglich nicht aufschlußreich. Das Eisen-Citrat-System wird unter diesen Bedingungen induziert. Wegen der vielen oxidierenden Faktoren (Citrat, Phosphat, Sauerstoff) im Test ist es, ohne physikalisch-chemische Bestimmungsmethoden heranzuziehen, kaum möglich, Schlüsse über die vorliegende oder überwiegende Oxidationsstufe des Eisens zu ziehen.

Ascorbat bewerkstelligt direkt oder indirekt aber unabhängig von den für die Fe^{3+}-Aufnahmesysteme benötigten Genfunktionen wie z.B. TonB, TonA und FecA eine Eisenaufnahme bei E. coli K12 (siehe 3.7.2). Es ist durchaus denkbar, daß diese Eisenversorgung durch eine Reduktion des Fe^{3+} zum besser löslichen Fe^{2+}, das dann durch ein spezielles Aufnahmesystem allein oder mit Hilfe eines Fe^{2+}-Ascorbat-Komplexes von E. coli aufgenommen wird. Zur Abklärung des Aufnahme-Mechanismus von Eisen in Gegenwart von Ascorbat könnte der Einsatz von radioaktiv markiertem Ascorbat und von stark oxidierenden Agenzien beitragen. Horowitz berichtete, daß Ascorbat vermutlich durch Reduktion des Eisens Siderophore (Siderochrome) bei Keimung und Wachstum einer Ornithin- und Siderophor-defekten Mutanten von Neurospora crassa ersetzt (private Mitteilung an V. Braun). Dieselbe Mutante konnte Citrat für ihre Keimung nicht benutzen. Das ebenfalls reduzierende Glutathion zeigte keinen vergleichbaren Effekt bei E. coli (eigene Beobachtung). Ob die Wirkung von Ascorbat lediglich auf der Reduktion des Eisens beruht oder ob andere Wirkungsmechanismen im Spiel sind, bleibt daher Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das citratabhängige Eisentransportsystem bei E. coli K12 besitzt eine hohe Spezifität. Es wird durch Citrat und Fluorocitrat induziert. Fluorocitrat kann Citrat im Eisenaufnahmeprozeß jedoch nicht ersetzen. Während 0,1 mM Citrat im Wachstumsmedium für die Primärinduktion und ihre Aufrechterhaltung notwendig ist, kann das intrazelluläre Citrat, obwohl mit 5 mM die Konzentration ausreichend wäre, die Induktion nicht einleiten. Das Wachstum in Gegenwart der Induktoren, Citrat und Fluorocitrat, führt nicht zur Erhöhung des intrazellulären Citratgehalts. Dies stimmt damit überein, daß keine signifikante Citrataufnahme gemessen werden konnte, die mit der Induktion oder der Eisenaufnahme korrelierbar wäre. Ein erhöhter Citratspiegel in der Zelle wie bei AB2847-Zellen nach Wachstum auf Fluoroacetat und bei der icd-Mutanten nach Wachstum auf Acetat induziert das Eisentransportsystem ebenfalls nicht. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Induktion von außen.

Für die Funktion des Citrats als Induktor ist Eisen notwendig: Die Komplexierung des freien Eisens des Mediums mit Desferri-Ferrichrom verhindert die Induktion des Eisen-Citrat-Systems durch Citrat sowohl bei der tonA-Mutanten als auch beim Wildtyp. Das gleiche Ergebnis konnte an der fepB-Mutanten mit DHB, aus der vermutlich Enterochelin synthetisiert wurde, demonstriert werden. Desferri-Ferrichrom verhindert die Induktion auch in Gegenwart von überschüssigem Kupfer. Daher ist ein Eisen-Citrat-Komplex als der Induktor anzusehen.

Neben seiner Genregulation wird die Aktivität des Eisen-Citratsystems reguliert. Zellen, die unter Eisenmangel angezogen werden, zeigen eine hohe, und die im eisenreichen Medium eine niedrige Eisenaufnahmeaktivität.

Für die citratabhängige Eisenaufnahme ist eine intakte äußere Membran notwendig. Induzierte Zellen zeigen nach Behandlung mit Pronase keine signifikante Eisen-Citrataufnahme mehr. Dagegen bleibt die Aufnahme über DHB und Ferrichrom weitgehend erhalten. Eisen-Ferrichrom wird nach der Behandlung an TonA vorbei transportiert. Diese Aufnahme ist tonB-abhängig.

Das Eisen-Citrat-System ist empfindlich gegen den osmotischen Schock. Dies zeigt die Notwendigkeit von schockbaren Komponenten (Bindeproteine) für seine Funktion. Dagegen ist das Ferrichromsystem mit dem Schock-resistenten Prolintransport vergleichbar.

N-Äthylmaleinimid hemmt alle drei untersuchten Transportsysteme, was auf die Beteiligung von SH-Gruppen am Eisentransport hinweist. Die Eisen-DHB-Aufnahme war die empfindlichste gegen den Inhibitor.

Unter anaeroben Bedingungen wird das Citrat-abhängige Eisentransportsystem nicht induziert. Aerob induziertes System wird im Laufe einer anaeroben Wachstumsphase auch in Gegenwart von Citrat ausverdünnt und nicht erhalten.

Neben den tonB-abhängigen Eisentransportsystemen verfügt E. coli über einen hochaffinen, von dieser Genfunktion unabhängigen Eisen-Ascorbattransport.

6. ANHANG

Versuch zur Bestimmung des Molekulargewichts des Eisen-Citrat-Komplexes

Zweck: Auf Grund unzureichender Informationen über Art und Stabilität des Eisen-Citrat-Komplexes im neutralen pH-Bereich im physiologischen Medium soll das Molekulargewicht des Komplexes unter den in dieser Arbeit verwendeten Transportbedingungen bestimmt werden.

Methode: Es wurde eine Gelfiltrationsmethode gewählt: Bio-Gel-P2 wurde in Eisenaufnahmepuffer (Na^+, 15 mM; K^+, 5 mM; PO_4^{3-}, 20 mM) bei pH 7 (pH wurde mit 3 : 1 NaOH/KOH eingestellt) gequollen, entgast und in eine Säule mit den Dimensionen 60 x 1,6 cm gefüllt. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer äquilibriert, dem 1 mM Citrat und 1 µM $FeCl_3$ zugesetzt wurde. Zu diesem Entschluß kam man, nachdem es unmöglich war, das radioaktive Eisen mit einem citratfreien Puffer oder H_2O von der Säule zu eluieren. Es wurden 100 - 250 µl-Proben aufgetragen, diese mit dem Citrat/Eisen-haltigen Puffer mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 10 ml/Std. eluiert und in 1 ml-Fraktionen gesammelt.

Der Eisen-Citrat-Komplex wurde über ^{14}C-Citrat- und ^{55}Fe-Radioaktivität verfolgt. Als Vergleichssubstanzen mit bekanntem Molekulargewicht wurden die in Abb. 39 angegebenen Peptide, ATP, AMP und ^{3}H-Ferrichrom verwendet. Die Peptide wurden mit der Fluram-Methode (2.18) gemessen und in der Abbildung als Transmission (T) angezeigt. ATP und AMP wurden durch Messung der Absorption im Gilford-Photometer bei 259 nm bestimmt.

Ergebnis und Diskussion: Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurden die Molekulargewichte der Vergleichssubstanzen in einem Diagramm gegen die Elutionsvolumina logarithmisch

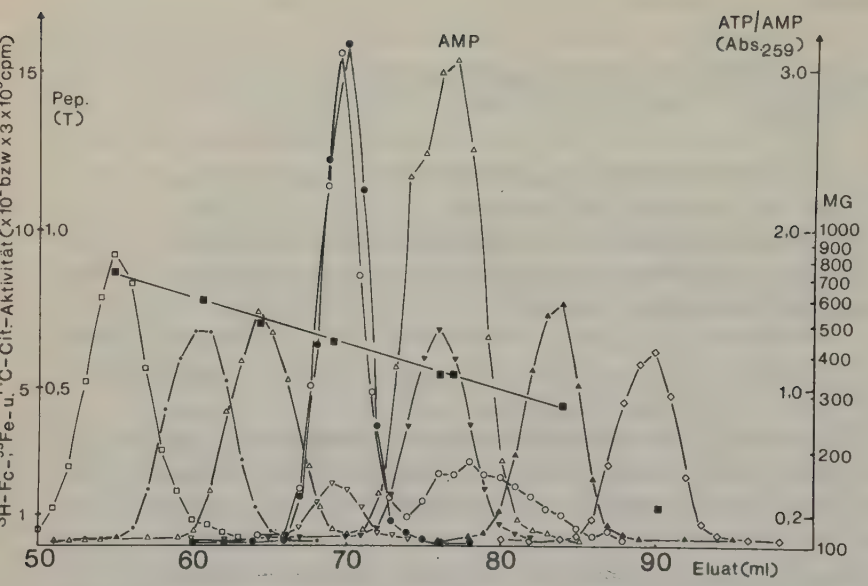


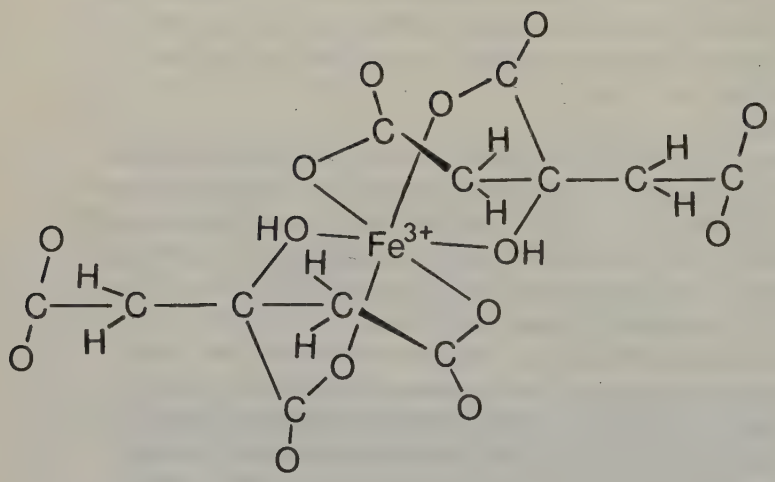
Abb. 39: Elutionsprofil vom Eisen-III-Citratkomplex und einigen Vergleichssubstanzen in einer P2-Bio-Gelsäule (60 x 1,6 cm). Säulenpräparation und Elutionspuffer sind dem Text zu entnehmen. Es wurden 250 µl-Proben aufgetragen. (□) ^{3}H-Ferrichrom (=^{3}H-Fc; MG=740), (•) 1 mg Glutathion, oxidiert (MG=612), (△) 300 µg ATP (GM=507), (▽) 150 µg Hexa-Alanin (MG=444), (●) 1 mM ^{14}C-Citrat/1 µM $FeCl_3$, (○) 1 mM Citrat/ 1 µM $^{55}FeCl_3$, (▼) 200 µg Tri-Leucin (MG=357,5), (△) 500 µg AMP (MG=347), (▲) 500 µg Tri-Serin (MG =279), (◇) 250 µg Di-Glycin (MG=132) und (■) logarithmische Auftragung der Molekulargewichte. Für das Molekulargewicht wurde jeweils die Peak-Spitze als bestimmend genommen.

eingetragen (Abb. 39). Bei der Eintragung wurde eine eventuelle Salzbildung (z.B. im Falle von ATP, AMP) oder Anlagerung von H_2O oder sonstige Reaktionen mit den Puffer-Komponenten nicht berücksichtigt.

Die Peak-Spitze der Elutionskurve des Eisen-Citrat-Komplexes lag bei 69 - 70 ml. Dies ergibt ein Molekulargewicht von etwa 440. Dieses Molekulargewicht entspricht 2 Citratmolekülen + 1 Eisen-Ion. Eine kleine Fraktion der ^{55}Fe-Aktivität erscheint in einem breiten Peak mit einer Spitze bei 78 ml, was einem MG von ca. 335 entspricht. Dies könnte ein Eisen-Citrat-Komplex mit der Zusammensetzung 1 : 1 sein (MG rechnerisch: 247). Da an dieser Elutionsposition ^{14}C-Citrat jedoch nie erhalten wurde, ist dies unwahrscheinlich. Es könnte sich um den Diphosphat-Eisen-Komplex handeln, der ein ähnliches MG (245) hat.

Angenommen, nur Citrat und Eisen sind an der Komplexbildung beteiligt, kann man aus dem Molekulargewicht der Hauptkomponente, die sowohl als ^{14}C-Citrat als auch als ^{55}Fe-Aktivität erfaßt wurde, auf einen Dicitrat-Eisen-Komplex schließen. Dies stimmt mit einem Befund von Spiro et al. (104) überein, daß bei pH 7 und Citratüberschuß von mindestens 20 : 1 ein 2Cit.:1Fe-Komplex entsteht. Diese Arbeitsbruppe hat auch festgestellt, daß Citrat hochpolymere Komplexe mit einem Molekulargewicht ähnlich dem der Aquohydroxypolymere des Eisens (ca. 10^5) bildet, wenn Citrat und Eisen je 1 mM im neutralen bis alkalischen Bereich inkubiert werden. Frost hat für den Dicitrat-Eisen-Komplex eine Stabilitätskonstante von $10^{18,83}$ errechnet (33). Eine weitere Arbeitsgruppe fand unter ähnlichen Bedingungen einen Komplex mit der Zusammensetzung $(2Fe^{3+}:3Cit.^{3-})^{3-}$ (16). Die oben diskutierten Daten, die für einen Eisen-Dicitratkomplex sprechen, und die durch Röntgenstrukturanalysen ermittelte stereochemische Struktur von Citrat (15, 37, 78) lassen die in Abb. 40 entworfene Komplexstruktur annehmen. Ein Modell (nicht gezeigt) des Moleküls läßt sich nachbauen.

Abb. 40: Strukturvorschlag des Eisen-III-Dicitrat-Komplexes.



7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alderman, E. M., Dillis, S. S., Melton, T. und Dobrogosz, W. J. (1979) J. Bacteriol. 140: 369-376

2. Ames, G. F. und Nikaido, H. (1976) Biochemistry 15: 616-623

3. Boyd, A. und Holland, I. B. (1977) FEBS Letters 76: 20-24

4. Boehringer Mannheim GmbH, Lebensmittelanalytik, UV-Test zur Bestimmung von Citronensäure in Lebensmitteln.

5. Brady, R. O. (1955) J. Biol. Chem. 217: 213-224

6. Braun, V. (1975) BBA 415: 335-377

7. Braun, V. (1977) Naturwissenschaften 64: 126-132

8. Braun, V. (1978) Symposia of the Society for General Microbiology XXVIII. "Relation between Structure and Function in the Procariotic Cell" (Stainer, R. Y., Rogers, H. J. und Ward, B. J., eds.): 111-138

9. Braun, V., Hancock, R. E. W., Hantke, K. und Hartmann, A. (1976) J. Supramolec. Struct. 5: 37-58

10. Braun, V. und Hantke, K. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43: 89-121

11. Braun, V. und Hantke, K. (1977) in "Microbial Interactions: Receptors and Recognition Series B" (ed. Reissig, J. L.) 3: 101-137

12. Braun, V. und Hantke, K. (1980) "Bacterial Cell Surface Receptors" (Manuscript)

13. Bullen, J. J., Rogers, H. J. und Griffiths, E. (1978) in Curr. Topics in Microbiol. and Immun. 80: 1-35

14. Carrano, C. J. und Raymond, K. N. (1978) J. Bacteriol. 136: 69-74

15. Carrell, H. L., Glusker, J. P., Villafranca, J. S., Mildvan, A. S., Dummel, R. J. und Kun, E. (1970) Science 170: 1412-1414

16. Coddington, A. und Perkins, D. J. (1960) BBA 44: 361-363

17. Cohen, N. G. und Monod, J. (1957) Bacteriol. Rev. 21: 169-194

18. Cohn, M. (1957) Bacteriol. Revs. 21: 140-168

19. Coulton, J. W. und Braun, V. (1979) J. Gen. Microbiol. 11o: 211-220

20. Cox, G. B., Gibson, F., Luke, R. K. J., Newton, N. A., O'Brien, I. G. und Rosenberg, H. (1970) J. Bacteriol. 104: 219-226

21. Dagley, S. (1970) in "Methoden der Enzymatischen Analyse", 2. Aufl., Bd. II, Bergmeyer, H. U. (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim, S. 1520-1523

22. Di Rienzo, J. M., Nakamura, K. und Inouye, M. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 481-532

23. Dietz, G. W. T. (1976) in Adv. Enzymol. (ed. Meister, A.) 44: 237-259

24. Drews, G. (1976) Mikrobiologisches Praktikum, 3. Auflage, (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York) 110-111

25. Dummel, R. J. und Kun, E. (1969) J. Biol. Chem. 244: 2966-2969

26. Eberspächer, B. (1979) Dissertation, Universität Tübingen

27. Eberspächer, B. und Braun, V. (1980) FEMS Microbiol. Lett. 7: 61-64

28. Ernst, J. F., Bennett, R. L. und Rothfield, L. I. (1978) J. Bacteriol. 135: 928-934

29. Ernst, J. F. und Winkelmann, G. (1977) BBA 500: 27-41

30. Essenberg, R. C. und Kornberg, H. L. (1975) J. Biol. Chem. 250: 939-945

31. Fanschier, D. W., Gottwald, L. K. und Kun, E. (1964) J. Biol. Chem. 239: 425-434

32. Friedberg, I. (1972) J. Bacteriol. 112: 1201-1205

33. Frost, G. E. (1974) Doctoral Thesis, Australian National University Canberra

34. Frost, G. E. und Rosenberg, H. (1973) Biochem. Biophys. Acta 330: 90-101

35. Frost, G. E. und Rosenberg, H. (1975) J. Bacteriol. 124: 704-712

36. Ganesan, A. T. und Lederberg, J. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 18: 824-835

37. Glusker, J. P. (1968) J. Mol. Biol. 38: 149-162

38. Haddock, B. A. und Jones, C. W. (1977) Bacteriol. Rev. 41: 47-99

39. Hancock, R. E. W. und Braun, V. (1976) FEBS Letters 65: 208-210

40. Hancock, R. E. W. und Braun, V. (1976) J. Bacteriol. 125: 409-415

41. Hancock, R. E. W., Hantke, K. und Braun, V. (1976) J. Bacteriol. 127: 1370-1375

42. Hantke, K. (1976) FEBS Letters 70: 109-112

43. Hantke, K. (1978) Molec. Gen. Genet. 164: 131-135

44. Hantke, K. und Braun, V. (1975) FEBS Letters 49: 301-305

45. Hantke, K. und Braun, V. (1975) FEBS Letters 59: 277-281

46. Hantke, K. und Braun, V. (1978) J. Bacteriol. 135: 190-197

47. Harris, D. C. und Aisen, P. (1973) BBA 329: 156-158

48. Hartmann, A. (1980) Dissertation, Universität Tübingen

49. Hartmann, A., Fiedler, H.-P. und Braun, V. 99 Eur. J. Biochem.: 517-524

50. Harvey, R. J. und Collins (1962) J. Bacteriol. 83: 1005-1009

51. Heppel, L. A. (1969) J. Gen. Physiol. 54: 95-109

52. Heppel, L. A. (1971) in "Structure and Function of Biological Membranes" (Rothfield, L., ed.) Academic Press, New York: 223-247

53. Hussein, S. (1977) Diplomarbeit, Universität Tübingen

54. Inouye, M. (1971) J. Biol. Chem. 246: 4834-4838

55. Ishiguro, N., Oka, C., Hanzawa, Y. und Sato, G. (1979) Appl. Environ. Microbiol. 38: 956-964

56. Jacob, F. und Monod, J. (1961) J. Mol. Biol. 3: 318-356

57. Kadner, R. J. und Bassford, P. J., Jr. (1978) in "Bacterial Transport" (Rosen, B. P., ed.) Marcel Dekker, New York: 413-462

58. Kalnitsky, G. und Barron, E. S. G. (1947) J. Biol. Chem. 170: 83-95

59. Kay, W. W. und Cameron, M. (1978) Archiv. Biochem. Biophys. 190: 270-280

60. Koser, S. A. (1923), J. Bacteriol. 8: 493-520

61. Krieger-Brauer, H. I. und Braun, V. (1980) Arch. Microbiol. 114: 233-242

62. Laemli, U. K. (1970) Nature 227: 680-685

63. Lakshmi, T. M. und Helling, R. B. (1977) Can. J. Microbiol. 24: 149-153

64. Lara, F. J. S. und Stokes, J. L. (1952) J. Bacteriol. 63: 415-420

65. Lawford, H. G. und Williams, G. R. (1971) Biochem. J. 123: 571-577

66. Lester, R. L. und De Moss, J. A. (1971) J. Bacteriol. 105: 1006-1014

67. Lo, T. C. Y. (1979) Can. J. Biochem. 57: 289-301

68. Lowry, O. H., Carter, J., Ward, J. B. und Glaser, L. (1971) J. Biol. Chem. 246: 6511-6521

69. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., Van der Hoek, P. und Van Alphen, L. (1975) FEBS Lett. 58: 254-258

70. Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H. und Berendsen, W. (1976) Mol. Gen. Genet. 147: 251-262

71. Lütgens, M. und Gottschalk, G. (1980) J. Gen. Microbiol. 119: 63-70

72. Lutkenhans, J. F. (1977) J. Bact. 131: 631-637

73. MacGregor, C. H., Schnaitman, C. A. und Normansell, D. E. (1974) J. Biol. Chem. 249: 5321-5327

74. Mallick, V. und Herrlich, P. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 5520-5523

74. Marcus, A. und Elliott (1956) J. Biol. Chem. 218: 823-830

76. McIntosh, M. A. und Earhart, E. F. (1977) J. Bacteriol. 131: 331-339

77. McKillen, M. N., Willecke, K. und Pardee, A. B. (1972) in "The Molecular Basis of Biological Transport" Academic Press, New York: 249-270

78. Mildvan, A. S. (1970) in "The Enzymes" Vol. II: 446-536

79. Mühlradt, P. F. (1976) J. Supramol. Struc. 5: 103-108

80. Mühlradt, P. F., Menzel, J., Golecki, J. R. und Speth, V. (1974) Eur. J. Biochem. 43: 533-539

81. Meyers, W. F. und Huang, K. Y. in "Methods in Enzymology" Vol. XIII: 431-434

82. Nakae, T. (1976) J. Biol. Chem. 251: 2176-2178

83. Nurminen, M. (1978) FEMS Microbiol. Lett. 3: 331-334

84. O'Brien, I. G. und Gibson, F. (1970) BBA 215: 393-402

85. Oehr, P. und Willecke, K. (1974) J. Biol. Chem. 249: 2037-2042

86. Osborn, M. Y., Gadner, Y. E., Parisi, E. und Larson, J. (1972) J. Biol. Chem. 247: 3962-3972

87. Peters, R. A. (1952) Proc. Roy. Soc. (London) 139: 143-170

88. Pollack, J. R. und Neilands, J. B. (1970) Biochem. Biophys. Res. Com. 38: 989-992

89. Poyer, J. L. und McCay, P. P. (1971) J. Biol. Chem. 246: 263-269

90. Pugsley, A. P. und Reeves, P. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 70: 846-853

91. Pugsley, A. P. und Reeves, P. (1976) J. Bacteriol. 127: 218-228

92. Pugsley. A. P. und Reeves (1977) J. Bacteriol. 130: 26-36

93. Rayman, M. K., Lo, T. C. Y. und Sanwal, B. D. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6332-6339

94. Raymond, K. N. und Carrano, C. J. (1979) Accounts Chem. Research 12: 183-190

95. Reithmeier, R. A. F. und Bragg, P. D. (1977) Can. J. Biochem. 55: 1082-1090

96. Reuser, A. J. J. und Postma, P. W. (1973) Eur. J. Biochem. 33: 584-592

97. Rosenberg, H. und Young, I. G. (1974) in "Microbial Iron Metabolism" (Neilands, J. B., ed.) Academic Press, New York, London: 67-82

98. Rosenbusch, J. P. (1974) J. Biol. Chem. 249: 8019-8029

99. Sadler, W. und Dworkin, M. (1966) J. Bacteriology 91: 1520-1525

100. Sato, T., Ito, K. und Yura, T. (1977) Eur. J. Biochem. 78: 557-567

101. Sillen, L. G. und Martell, A. E.: Stability Constants of Metal Ion Complexes. Special Publication No. 17. The Chemical Society, London, 1964

102. Smit, J., Kamio, Y. und Nikaido, H. (1975) J. Bact. 124: 942-958

103. Smith, H. W., Parsell, Z. und Green, P. (1978) J. Gen. Microbiol. 109: 305-311

104a) Spiro, T. G., Pape, L. und Saltman, P. (1967) J. Am. Chem. Soc. 89: 5555-5559

104b) Spiro, T. G., Bates, G. und Saltman, P. (1967) J. Am. Chem. Soc. 89: 5559-5562

105. Szmeleman, S. und Hofnung, M. (1975) J. Bacteriol. 124: 112-118

106. Treick, R. W. und Konetzka (1964) J. Bacteriol. 88: 1580-1584

107. Van Alphen, L., Van Alphen, W., Verkeij, A. und Lugtenberg, B. (1979) Biochem. Biophys. Acta 556: 233-243

108. Van Alphen, W., Van Boxtel, R., Van Selm, N. und Lugtenberg, B. (1978) FEMS Microbiol. Lett. 3: 103-106

109. Van Alphen, W., Van Selm, N. und Lugtenberg, B. (1978) Molec. Gen. Genet. 159: 75-83

110. Villarreal-Moguel, E. I. und Ruiz-Herrera, J. (1969) J. Bacteriol. 98: 552-558

111. Wagegg, W. (1980) Dissertation, Universität Tübingen

112. Watland, D. C., Wang, S. C., Kalnitsky, G. und Hummel, J. P. (1957) Arch. Biochem. Biophys. 67: 138-144

113. Weidel, W. und Pelzer, H. (1964) Adv. Enzymol. 26: 193-232

114. Wheat, R. W. und Ajl, S. J. (1955) J. Biol. Chem. 217: 897-920

115. Wilkerson, L. S. und Eagon, R. G. (1972) Archiv. Biochem. Biophys. 149: 209-221

116. Willecke, K., Gries, E. und Oehr, P. (1973) J. Biol. Chem. 248: 807-814

117. Winkelmann, G. (1979) Archiv. Microbiol. 121: 43-51

118. Winkelmann, G. und Zähner, H. (1973) Archiv. Microbiol. 88: 49-60

119. Winkler, H. H. (1970) J. Bacteriol. 101: 470-475

120. Winkler, H. H. (1971) J. Bacteriol. 107: 74-78

121. Woodrow, G. C., Langman, L., Young, I. G. und Gibson, F. (1978) J. Bacteriol. 133: 1524-1526

122. Young, I. G., Cox, G. B. und Gibson, F. (1967) BBA 141: 319-331

LEBENSLAUF

Saber Mahmoud Khader Mohammed Hussein

3. 2. 1950	geboren in Al-Khader/Palästina
1956 - 1965	Besuch der Grund- und Mittelschule, Madrasat Al-Khader Al-I'dadiyyah, in Al-Khader
1965 - 1968	Besuch des Gymnasiums, Madrasat Beit Lahm Al-Thanawiyyah, in Bethlehem
Juni 1968	Reifeprüfung (Imtihan Al-Thanawiyyah Al-'Aammah = General Secondary Education Certificate (Scientific Stream)) in Bethlehem
1969 - 1970	Besuch des Goethe Instituts in Staufen im Breisgau
1970 - 1971	Besuch des Studienkollegs der Universität Heidelberg
März 1971	Immatrikulationsprüfung am Studienkolleg
ab SS 1971	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
April 1973	Diplomvorprüfung in Biologie
Januar 1977	Diplomhauptprüfung in Biologie
ab März 1977	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Altendorf, W. Bessler, V. Braun, U. Feine, J. Gugelielmi, K. Hantke, W. Harder, E. Kallee, W. Löffler, K. Mägdefrau, D. Mecke, H. Metzner, G. F. Meyer, G. Mickoleit, F. Möhres, E. Müller, H. Ninnemann, E. Pracht, H. Probst, A. Rieker, H. Schenk, K. Schilde, V. Schwartz, B. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert, K. Wegmann, G.Weitzel, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner